

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
DERMATOLOGIA SPERIMENTALE**

**XXI Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Fabio Ayala**

**TESI DI DOTTORATO**

**ESPRESSIONE E REGOLAZIONE DEI FATTORI  
PROANGIOGENICI NEI MASTOCITI UMANI NORMALI  
E DI PAZIENTI CON MASTOCITOSI**

**TUTOR**

**Chiar.mo  
Prof. Fabio Ayala**

**CANDIDATA**

**Dott. Stefania Loffredo**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 1</i>
 <b>MATERIALI E METODI</b>	 <i>pag. 12</i>
- Reagenti e tamponi	<i>pag. 12</i>
- Isolamento, purificazione e coltura dei mastociti umani	<i>pag. 13</i>
- Isolamento, purificazione dei macrofagi polmonari umani	<i>pag. 15</i>
- RT-PCR	<i>pag. 16</i>
- ELISA per VEGF-A, VEGF-C e PlGF	<i>pag. 17</i>
- Western Blot	<i>pag. 18</i>
- Saggio della membrana Corioallantoidea di Pollo	<i>pag. 19</i>
- Dosaggio dell'attività PLA <sub>2</sub>	<i>pag. 20</i>
- Dosaggio dell'istamina	<i>pag. 21</i>
- Analisi statistiche	<i>pag. 22</i>
 <b>RISULTATI</b>	 <i>pag. 23</i>
- Espressione dell'mRNA per i VEGF e PlGF nei mastociti umani	<i>pag. 23</i>
- Analisi del contenuto di VEGF-A e PlGF nei mastociti umani	<i>pag. 23</i>
- Analisi del contenuto di VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani	<i>pag. 24</i>
- Secrezione spontanea di VEGF-A e di PlGF dai mastociti umani	<i>pag. 25</i>
- Effetto della PGE <sub>2</sub> sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani	<i>pag. 25</i>

- Effetto della $PGE_2$ sull'espressione dell'mRNA per i VEGF nei mastociti umani	pag. 26
- Effetti di un analogo dell'adenosina (NECA) sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani	pag. 27
- Effetto di NECA sull'espressione dell'mRNA per i VEGF nei mastociti umani	pag. 27
- Effetto dei sopranatanti dei mastociti umani sulla risposta angiogenica in vivo	pag. 28
- Espressione di varie isoforme di $sPLA_2$ nei mastociti umani	pag. 29
- Effetti dell'attivazione immunologica sulla secrezione di $sPLA_2$ da parte dei mastociti polmonari umani	pag. 30
- Effetto della hGIIA e della hGX sulla secrezione di VEGF-A e VEGF-C dai macrofagi polmonari umani	pag. 32
- Effetto di hGX sull'espressione dell'mRNA per i VEGF nei macrofagi polmonari umani	pag. 34
- Effetto dei sopranatanti dei macrofagi polmonari umani sulla risposta angiogenica in vivo	pag. 34
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 36
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 45
<b>FIGURE</b>	

## INTRODUZIONE

Nel 1978 il patologo tedesco Paul Ehrlich identificò i mastociti nei tessuti umani e li definì “mastzellen” (1). Durante il suo dottorato descrisse i mastociti come “cellule granulari del tessuto connettivo”. Il termine “mast”, che deriva dalla parola greca *mastos* che significa seno, fu attribuito a queste cellule in quanto Ehrlich ritenne che i caratteristici granuli dei mastociti fossero fonte di cibo per le cellule limitrofe (1, 2). L’origine dei mastociti rimase sconosciuta per quasi 100 anni. Oggi è ben conosciuto che i mastociti originano da progenitori midollari ( $CD34^+CD117^+CD13^+Fc\epsilon RI^+CD14^-$ ) in grado di completare la loro maturazione fenotipica dopo la migrazione nei tessuti periferici (3-5). Il fenotipo dei mastociti dipende strettamente dal microambiente tessutale dove la cellula progenitrice migra. Le citochine locali e l’interazioni con le cellule residenti determinano l’eterogeneità fenotipica e funzionale dei mastociti (6-9).

I mastociti sono cellule secretorie multifunzionali caratterizzate dalla presenza di numerosi granuli citoplasmatici contenenti mediatori preformati che possono promuovere o sopprimere lo sviluppo, la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione o la funzione delle cellule del sistema immunitario (10). Questi granuli sono costituiti da una matrice proteoglicanica (eparina), enzimi proteolitici (es. triptasi, chimasi, carbossipeptidasi A) e da istamina. I mediatori lipidici, prostaglandine e leucotrieni sono sintetizzati *de novo* e secreti dopo attivazione. I mastociti hanno anche la capacità di produrre diverse chemochine, citochine e fattori di crescita, tra le quali IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16,

MCP-1, TNF- $\alpha$  e NGF (11). Tutti questi mediatori hanno un ruolo importante non solo nell'immunità innata e in quella specifica, ma anche nella regolazione delle risposte infiammatorie.

I mastociti possono essere attivati in diversi modi. A seconda del tipo di attivazione i mastociti rilasciano uno specifico profilo di mediatori. L'attivazione dei mastociti può essere indotta da diversi stimoli immunologici di tipo IgE-mediati. Gli antigeni multivalenti e gli anticorpi anti-IgE interagiscono con specifici anticorpi della classe IgE legati ad un recettore ad alta affinità (Fc $\epsilon$ RI) espresso sulla membrana cellulare. Tale processo comporta il rilascio da parte dei mastociti di mediatori preformati (istamina, triptasi ecc.), di mediatori sintetizzati *de novo* (metabolici dell'acido arachidonico) e di diverse citochine e chemochine (12). Altri attivatori mastocitari non IgE-mediati sono: oppiacei, componenti della cascata del complemento, neuropeptidi, citochine, chemochine, parassiti e batteri patogeni (13). Non sempre l'attivazione mastocitaria è accompagnata da degranulazione (14).

Lo Stem cell factor (SCF), il ligando per il recettore tirosin-chinasico KIT, costitutivamente espresso sulla membrana dei mastociti, è la citochina più importante nel processo di crescita e differenziamento dei mastociti e per la loro sopravvivenza (15). Le mutazioni del *kit* (codificante KIT) generano un gruppo eterogeneo di condizioni morbose denominate mastocitosi. Le mastocitosi sono caratterizzate da un marcato aumento del numero dei mastociti in specifiche sedi anatomiche (cute, midollo osseo, linfonodi, tratto gastro-intestinale, fegato, milza) (16). Le mutazioni di *kit* associate alla mastocitosi comportano l'attivazione autocatalitica del *kit* e la conseguente proliferazione dei mastociti

indipendentemente dalla presenza dello SCF. La deplezione dello SCF *in vitro* conduce alla morte dei mastociti, ed il numero dei mastociti, in topi con la mutazione del gene codificante l'SCF, è dell'1% rispetto al fenotipo normale (17, 18).

I mastociti sono cellule particolarmente abbondanti a livello delle superfici di contatto tra l'organismo e l'ambiente esterno. Sono presenti in tutti i tessuti connettivi e sono prevalentemente localizzati nel tratto gastrointestinale, nella cute (6), nelle mucosa dell'apparato respiratorio ed in prossimità dei vasi sanguigni e linfatici e delle fibre nervose (19). Queste cellule agiscono come sentinelle e sono probabilmente le prime, insieme ai macrofagi, ad intervenire nelle risposte infiammatorie e nelle risposte della immunità innata contro agenti infettivi di tipo virale e batterico (20). I mastociti partecipano attivamente all'immunità specifica presentando l'antigene al Complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe I e II (21, 22). I mastociti reclutano le cellule dendritiche nei siti d'infiammazione dove si attivano e presentano l'antigene ai linfociti T. Alcuni mediatori dei mastociti (istamina, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o GM-CSF) sono capaci di indurre la maturazione delle cellule dendritiche (23). I mastociti nei siti d'infiammazione e nei siti tumorali cooperano attivamente con i macrofagi, promuovendo od inibendo le funzioni macrofagiche (24, 25).

I mastociti svolgono un ruolo primario nella patogenesi delle malattie allergiche, come l'asma bronchiale, la rinite allergica e l'orticaria (12). In queste patologie l'attivazione, IgE-mediata o non IgE-mediata, di queste cellule induce la secrezione di numerosi mediatori proinfiammatori preformati e neosintetizzati.

Molteplici evidenze sperimentali hanno documentato l'importanza dei mastociti in diversi processi infiammatori cronici (6) e nello sviluppo tumorale (26). I mastociti infiltrano i siti di infiammazione cronica (27), processo che in alcune condizioni può indurre la formazione di neoplasie maligne (28). La densità dei mastociti è incrementata ai margini di numerosi tumori nell'uomo (29-32) e nei roditori (33). L'infiltrazione dei mastociti nella lesione tumorale è strettamente correlata ai fenomeni dell'angiogenesi e della linfoangiogenesi ed alle metastasi (34-38).

Il termine "Angiogenesi" indica la crescita di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti. La formazione di vasi attraversa stadi ben definiti caratterizzati da modificazioni dell'endotelio vascolare e della matrice extracellulare (39). In particolare, il processo angiogenico si articola in quattro fasi: durante la prima fase si verifica una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali seguita da un aumento della permeabilità vasale; successivamente, le cellule endoteliali migrano e proliferano nella zona di tessuto dove è richiesta la formazione di nuovi vasi. La terza fase è contraddistinta dall'arresto della proliferazione cellulare, dalla differenziazione di cellule endoteliali e la formazione di capillari primitivi. Il processo si conclude con il richiamo di cellule subendoteliali di supporto come i periciti che ricoprono le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce in grado di regolare la perfusione sanguigna (39).

Il sistema linfatico si sviluppa attraverso un processo analogo definito "Linfoangiogenesi" (40).

Angiogenesi e linfoangiogenesi rappresentano due fenomeni, distinti e complessi, controllati da un delicato bilancio tra fattori ad attività pro-angiogenica e fattori ad attività anti-angiogenica. La famiglia dei *Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)* comprende diversi mediatori ad attività pro-angiogenica tra cui il VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ed il Placental Growth Factor (PlGF) (41). Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è un mediatore fondamentale nella regolazione del processo angiogenico ed il più potente fattore pro-angiogenico finora identificato (41). Oltre alla modulazione della migrazione e della proliferazione delle cellule endoteliali, il VEGF esplica molteplici attività pro-angiogeniche. Esso, infatti, induce nelle cellule endoteliali l'espressione di proteasi (collagenasi, uPA e tPA) che liberano le cellule dall'ancoraggio alla matrice extracellulare permettendo la loro migrazione. Inoltre, il VEGF promuove la mobilitazione delle cellule staminali emopoietiche dal midollo, l'attivazione degli osteoblasti, la chemiotassi di diverse cellule del sistema immunitario e la regolazione dell'omeostasi neuronale (42, 43).

VEGF-A e -B rappresentano mediatori fondamentali nella formazione dei vasi sanguigni (41); viceversa VEGF-C e -D regolano prevalentemente la formazione di nuovi vasi linfatici (44, 45). Alcuni di questi fattori presentano varie isoforme, con differente potenziale pro-angiogenico, derivanti da meccanismi di splicing alternativo. In particolare, sono state identificate 6 isoforme per il VEGF-A: VEGFA<sub>121</sub>, VEGFA<sub>145</sub>, VEGFA<sub>165</sub>, VEGFA<sub>183</sub>, VEGFA<sub>189</sub> e VEGFA<sub>206</sub> (41). VEGF-A<sub>165</sub> è la forma predominante. Il VEGF-B presenta due isoforme: VEGFB<sub>167</sub> e VEGFB<sub>186</sub>. L'isoforma 167 è la forma predominante ed interagisce con l'eparina



(46). Il PlGF, originariamente scoperto a livello placentare dal gruppo di Graziella Persico (47) modula lo sviluppo dei vasi della placenta e di alcuni tumori (48). Esso presenta tre isoforme: PlGF<sub>131</sub>, PlGF<sub>152</sub> e PlGF<sub>203</sub> (49, 50).

I membri della famiglia del VEGF esplicano la loro azione mediante l'interazione con tre recettori di membrana: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (41). Dal punto di vista strutturale, questi recettori presentano una porzione extracellulare costituita da 7 domini immunoglobulinici (Ig-like), un tratto transmembrana (51) ed una coda intracitoplasmatica responsabile dell'attività tirosin-chinasica.

Molteplici studi indicano che l'angiogenesi e la linfoangiogenesi sono associate al rimodellamento tessutale che si osserva in corso di diverse malattie infiammatorie croniche tra cui l'artrite reumatoide (52), la malattia di Crohn (53) e l'asma bronchiale (54). Inoltre, è stata riportata l'esistenza di una significativa correlazione tra neoformazione vascolare e severità dell'asma bronchiale (55, 56). E' stato prospettato, che a livello delle vie aeree, i fattori angiogenici siano sintetizzati da diverse cellule del sistema immunitario come gli eosinofili, i macrofagi (57), i mastociti (58), le cellule muscolari lisce (59) e le cellule epiteliali (60). E' verosimile che stimoli infiammatori siano in grado di attivare i mastociti, insieme ad altre cellule del sistema immunitario, inducendo la sintesi di diverse chemiochine, citochine e fattori proangiogenici. E' opportuno ricordare che studi sperimentali hanno documentato che i meccanismi dell'angio/linfoangiogenesi contribuiscono alla crescita tumorale ed alla formazione delle metastasi (41, 45).

Studi *in vitro* effettuati su modelli murini hanno dimostrato che i mastociti possono produrre diversi fattori angiogenici (61, 62). Ulteriori studi ottenuti su linee

mastocitarie umane trasformate, come le HMC-1, indicano che queste cellule neoplastiche producono fattori angiogenici *in vitro* (61, 63-65). Inoltre, risultati ottenuti da colture primarie di mastociti umani derivati dal midollo osseo e dal sangue del cordone ombelicale hanno dimostrato che queste cellule sintetizzano alcuni membri della famiglia del VEGF (61, 63, 64).

E' importante sottolineare che i risultati di questi studi *in vitro* hanno evidenziato delle differenze significative nella produzione di fattori angiogenici e dei loro recettori tra i diversi tipi di mastociti umani e di mastociti ottenuti da roditori (61-65). Non sono attualmente disponibili dati sulla produzione di fattori angiogenici da colture primarie di mastociti umani.

Pertanto, nella prima parte di questo studio, abbiamo caratterizzato l'espressione molecolare, la produzione e la funzione dei diversi membri della famiglia del VEGF, in tre diversi tipi di mastociti umani: mastociti umani purificati dal tessuto polmonare (HLMC), linee mastocitarie differenziate (LAD-2) (66) e linee mastocitarie leucemiche (HMC-1) (67).

Nella seconda parte di questo progetto, abbiamo studiato la capacità dei mastociti umani di sintetizzare le fosfolipasi A2 secretorie, una nuova classe di mediatori proinfiammatori e proangiogenici. Le fosfolipasi A2 (PLA<sub>2</sub>) sono enzimi che catalizzano l'idrolisi dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana (68). Sono state descritte diverse isoforme di PLA<sub>2</sub> (Tabella I). La prima importante distinzione è tra le PLA<sub>2</sub> secretorie (sPLA<sub>2</sub>) e le PLA<sub>2</sub> citosoliche (cPLA<sub>2</sub>). Le sPLA<sub>2</sub> sono molecole a basso peso molecolare, localizzate nei granuli citoplasmatici, e secrete nel ambiente extracellulare dove trovano le concentrazioni

di calcio millimolari necessarie per la loro attivazione (69). Sono state identificate 10 isoforme di sPLA<sub>2</sub> (Tabella III) e la loro espressione può variare in maniera significativa da cellula a cellula e da tessuto a tessuto, anche in dipendenza dalle condizioni fisiopatologiche (68). Elevati livelli di sPLA<sub>2</sub> sono stati rilevati nel plasma di pazienti affetti da patologie infiammatorie a carattere sistemico (pancreatite acuta, shock settico) (70, 71), nelle sedi locali di infiammazione (vie aeree dei pazienti con asma bronchiale, cavità articolare di pazienti con artrite reumatoide) (72, 73) e in diversi tumori (utero, mammella e colon) (74). I livelli sierici di sPLA<sub>2</sub> correlano positivamente con la severità, la prognosi e la mortalità di queste patologie (70, 75-78). Le sPLA<sub>2</sub> sono anche in grado di attivare alcune funzioni cellulari e di indurre nelle cellule infiammatorie la produzione di mediatori chimici diversi dagli eicosanoidi e dal PAF. Ad esempio, alcune sPLA<sub>2</sub> inducono nelle cellule infiammatorie (eosinofili, neutrofili, monociti, macrofagi) l'esocitosi (79, 80), l'espressione di molecole di superficie (81, 82), la chemiotassi (83, 84), la produzione di citochine (80, 85, 86), chemochine (85, 87, 88) ed ossido nitrico (89).

Recenti evidenze indicano che le sPLA<sub>2</sub> possono partecipare al mantenimento e allo sviluppo dei tumori sostenendo la sintesi di mediatori angiogenici e linfoangiogenici. È stato dimostrato che mastociti murini esprimono molte isoforme di sPLA<sub>2</sub> (90). Esperimenti di immunoistochimica hanno, inoltre, evidenziato l'espressione della sPLA<sub>2</sub> di gruppo IIA in mastociti sinoviali ed intestinali umani (91, 92). Tuttavia, quali siano le forme di sPLA<sub>2</sub> espresse dai mastociti polmonari umani ed quale sia il ruolo che questi enzimi potrebbero esercitare nei processi di proangiogenici non sono stati ancora chiariti.

## MATERIALI E METODI

### *Reagenti e Tamponi*

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: 60% HClO<sub>4</sub> (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), inibitori delle proteasi, 5'-(N-etilcarbosamido) adenosina (NECA), monotioglicerolo, L-glutamina, il DMSO, il lipopolisaccaride (LPS) di *Escherichia coli* di sierotipo 026:B6, il Percoll<sup>®</sup> (densità 1,077), la piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), il PMSF, il Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); IMDM e soluzione antibiotica (10,000 UI/ml penicillina and 10 mg/ml streptomicina) (Cambrex Bio Science, Milano, Italia); siero bovino fetale (FCS, MP Biomedicals Europe, Illkirch, Francia), PGE<sub>2</sub> (Biomol, Plymouth Meeting, PA); StemPro<sup>®</sup>34 SFM medium, Superscript III (Invitrogen Ltd., Paisley, UK); stem cell factor umano ricombinante (SCF) e PlGF-1 umano ricombinante (PeproTech, Londra, UK); RPMI (GIBCO, Life Technologies Gaithersburg, MD) con 25 mM Hepes; la chimopapaina di *Papaya Latex*, il ditiotreitolo (DTT), ICN (Costa Mesa, CA); la collagenasi di *Clostridium histolyticum*, la DNAsi tipo I di pancreas bovino, lo ionoforo A23187, la pronasi di *Streptomyces griseus* da Calbiochem Behring Co. (La Jolla, CA, USA); dosaggio colorimetrico per proteine (BIORAD, Richmond, CO); anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-B (H-70), anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-C (H-190), anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGF-D (H-144), anticorpi di capra IgG e di topo IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticorpi di capra anti-VEGF-A, VEGF-A<sub>165</sub> umano ricombinante, VEGF-B<sub>167</sub>

umano ricombinante, VEGF-C umano ricombinante, VEGF-D umano ricombinante, (R&D System, Minneapolis, MN); IgG di scimmia anti-coniglio HRP-coniugato (GE Healthcare, Amersham, England). La hGIIA, hGX , AZ-1, pyrrolidine-1 e Me-Indoxam sono stati donati dal Prof. Michael H. Gelb (*University of Washington, Seattle, WA, USA*). Il composto LY311727 è stato donato dal Dr. Jerome H. Fleisch (*Lilly Research Labs, Indianapolis, IN, USA*). Le membrane di *Escherichia coli* radiomarcate con [<sup>3</sup>H]-Acido oleico ([<sup>3</sup>H]-AO) sono state donate dal Prof. Gianfrancesco Goracci (Università di Perugia, Italia). L'anticorpo di coniglio anti-Fcε umano è stato donato dai Prof. T. Ishizaka e K. Ishizaka (*La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA, USA*). Tutti gli altri prodotti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Il tampone PIPES è composto di 25 mM piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), 110 mM NaCl e 5 mM KCl, pH 7,4. Il tampone PCG è composto da tampone PIPES contenente 1 mM CaCl<sub>2</sub> ed 1 g/L D-glucosio, pH 7,4. Il tampone PGMD è composto da tampone PIPES contenente 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 mg/L DNAsi ed 1 g/L gelatina, pH 7,4. Il tampone PBS 0,15 M è composto da 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4.

#### *Isolamento, purificazione e coltura dei mastociti umani*

Il protocollo di studio riguardante l'utilizzo di tessuto polmonare umano è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Napoli Federico II ed il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia toracica. Colture primarie di mastociti polmonari umani (HLMC) sono state

ottenute dal parenchima polmonare dei suddetti pazienti. Il tessuto polmonare macroscopicamente sano è stato finemente tagliato con le forbici. I frammenti sono stati dispersi nei loro elementi cellulari attraverso incubazione sequenziale con pronasi (2 mg/g di tessuto), chimopapaina (0,5 mg/g di tessuto), collagenasi (1 mg/g di tessuto) ed elastasi (10 U/g di tessuto). Le cellule sono state risospese in PGMD ed ulteriormente purificate attraverso elutriazione controcorrente. Dopo questa procedura, le frazioni contenenti le maggiori percentuali di mastociti (15-20%) sono state selezionate ed ulteriormente purificate (> 80%) attraverso centrifugazione su gradienti di densità. Le cellule sono state purificate (>97%) mediante selezione immunomagnetica positiva utilizzando il CD117 Microbead Kit (Miltenyi Biotec). Il numero e la purezza dei mastociti sono stati determinati attraverso una colorazione con toluidina/Alcian blue. La linea mastocitaria umana HMC-1 è stata gentilmente donata dal Dr. John H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN); le cellule sono state mantenute in coltura ad una densità di  $3-9 \times 10^5$  cellule/ml di IMDM supplementato con 10% FCS, 2 mM di L-glutamina, 1,2 mM di monotioglicerolo, 1% penicillina/streptomicina. La linea mastocitaria umana LAD-2 è stata generosamente donata dal Dr. Dean D. Metcalfe (NIH, Bethesda, MD); le cellule sono state mantenute in coltura con una densità di  $2-5 \times 10^5$  cellule/ml di StemPro®34 SFM medium contenente SCF 100 ng/ml, 2 mM L- glutamina e 1% di soluzione antibiotica. Per gli esperimenti, HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state incubate in piastre di polistirene (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) in 1% di IMDM con aminoacidi non essenziali, 5% di FCS e 10 µg/ml di gentamicina da soli o contenenti una concentrazione ottimale di PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) o NECA ( $10^{-5}$

M). In alcuni esperimenti gli HLMC sono stati risospesi in tampone PCG ( $10^6$ /ml) e stimolati (15-120 min,  $37^\circ\text{C}$ ) con anticorpo anti-IgE (0,03-1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

#### *Isolamento, purificazione dei macrofagi polmonari umani*

I macrofagi polmonari (HLM) sono stati isolati dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia toracica con una metodica utilizzata nel nostro laboratorio da molti anni (85). Il tessuto polmonare macroscopicamente sano è stato tagliato in piccoli frammenti in tampone PIPES. La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a filtrazione su strato di Nytex (con pori di 120  $\mu\text{m}$  di diametro) mediante ripetuti lavaggi con tampone PIPES. Le cellule sono state separate mediante centrifugazione (2.000 rpm, 20 min,  $22^\circ\text{C}$ ) su gradienti discontinui di Percoll. La sospensione arricchita di macrofagi ( $>80\%$ ) è stata risospesa ( $10^6$  cellule/ml) in RPMI contenente 5% FCS, 2 mM L-glutamina e 1% soluzione antibiotico-antimicotica ed incubate in piastre di polistirene a  $37^\circ\text{C}$  in un'atmosfera contenente il 5% di  $\text{CO}_2$ . Dopo 12 ore il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule non aderenti sono state allontanate mediante lavaggio con RPMI. Questa procedura consente di ottenere una popolazione cellulare contenente  $>98\%$  di macrofagi, come dimostrato dalla positività al test dell' $\alpha$ -naftil-acetato esterasi (80) e come dimostrato dalla positività all'analisi citofluorimetrica per alcuni marcatori di superficie specificamente espressi dai macrofagi (CD11c/CD86/HLA DR) (93). Per gli esperimenti, gli HLM sono stati incubati (3-48 ore) in piastre di polistirene (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) in RPMI contenente 2% FCS, 2 mM L-glutamina e 1% soluzione antibiotico-

antimicotica da soli o contenenti concentrazioni crescenti di hGIIA e hGX (0,1-10 µg/ml).

### *RT-PCR*

RNA totale ottenuto dalle HLMC, LAD-2, HMC-1 e HLM è stato isolato mediante il sistema di isolamento dell'RNA totale SV 96 (PROMEGA) e trattato con RNase-free DNase I in accordo con il protocollo fornito dal produttore. RNA è stato quantizzato mediante spettrofotometria. 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA con 25 mM di MgCl<sub>2</sub>, 50 µM di oligo(dT) e 200 U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per la PCR semi-quantitativa, 2 µl di cDNA retrotrascritto sono stati successivamente amplificati utilizzando primers specifici per: i fattori angiogenici (VEGF-A, VEGF-B, PlGF), i fattori linfoangiogenici (VEGF-C e VEGF-D), le sPLA<sub>2</sub> (hGIB, hGIIA, hGIID, hGIIIE, hGIIIF, hGIIL, hGV, hGX, hGXIIA, hGXIIIB) e per GAPDH utilizzato come controllo (Tabella II e III). I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita con luminescenza *UV-image analysis system ChemidocXRS* (Biorad). La real-time PCR (qRT-PCR) è stata effettuata come segue: i mastociti (4 x 10<sup>6</sup>/2 ml) sono stati incubati (37°C) in IMDM supplementato con 1% di aminoacidi non essenziali, 5% di FCS e 10 µg/ml di gentamicina con o senza PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) o NECA (10<sup>-5</sup> M) per tempi differenti (3–9 ore); gli HLM (5 x 10<sup>6</sup>/2 ml) sono stati incubati (37°C) in RPMI supplementato con 2% di FCS, 2 mM L-glutamina e 1% soluzione antibiotico-antimicotica con o senza hGX (3 µg/ml) o NECA (10<sup>-5</sup> M) per



tempi differenti (3–18 ore). Alla fine dell'incubazione, RNA totale è stato isolato e retrotrascritto come precedentemente riportato. La qPCR è stata eseguita su iCycler (Biorad) utilizzando il Platinum qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primers specifici per VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-B<sub>167</sub> compatibili per la qPCR sono stati disegnati dal Beacon Designer 3.0 software (Biorad) (Tabella I). Sono stati utilizzati i primers per GAPDH, VEGF-C e VEGF-D riportati in Tabella I e compatibili per qRT-PCR. Dopo una iniziale denaturazione a 94°C per 30 sec, è stata effettuata un'amplificazione a 40 cicli con denaturazione (94°C) per 30 sec, appaiamento (55°C) per 30 sec ed estensione dei primers (72°C). Alla fine è stata eseguita un'estensione a 72°C per 10 min. L'efficacia della PCR è stata esaminata diluendo in maniera sequenziale e sono stati ottenuti i risultati delle curve di melting per controllare la specificità della PCR. Ogni campione di cDNA è stato analizzato in triplicato mentre un campione privo di mRNA è stato incluso come controllo negativo. I risultati sono stati analizzati con *Cycler iQ analysis software* (Biorad). I segnali di mRNA in ogni campione sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti dal GAPDH e le differenze per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D sono state espresse come incremento in numero di volte verso quello delle cellule non stimulate.

#### *ELISA per VEGF-A, VEGF-C e PlGF*

Il contenuto di VEGF-A, VEGF-C e PlGF nei lisati cellulari e nei sopranatanti delle colture dei mastociti e dei macrofagi è stato determinato in duplicato utilizzando un dosaggio ELISA commercialmente disponibile (R&D System,

Minneapolis, MN). Il range di linearità di questi dosaggi era: 30,5-2000 pg/ml (VEGF-A), 93,5-6000 pg/ml (VEGF-C). Dal momento che il numero delle cellule aderenti (macrofagi) nei pozzetti può variare nell'ambito dello stesso esperimento e tra i diversi esperimenti, i risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine determinato nei campioni cellulari lisati con Tryton 0,1% utilizzando il metodo di Lowry (94).

### *Western blot*

Le cellule ( $2-4 \times 10^6$  per campione) sono state lisate in tampone di lisi (20 mM di Tris pH 7,5, 5 mM di EDTA, 1 mM di PMSF, 2 mM di benzamidina, 10 µg/ml di leupeptina, 10 mM di NaF, 150 mM di NaCl, 1% di Nonidet P-40 e 5% di glicerolo) (95). I lisati cellulari sono stati mantenuti in ghiaccio per 20 min e poi centrifugati (14.000 rpm, 4°C, 20 min). Un'aliquota dell'estratto proteico ottenuto dal lisato cellulare è stata utilizzata per quantificare le proteine con BCA Protein Assay Kit (Novagen, Merck Chemicals, Nottingham, UK). La restante aliquota dell'estratto proteico è stata diluita in litio dodecil-solfato (LDS) con o senza 2β-mercaptoetanolo al 2,5% e conservata a -80°C. Gli estratti proteici (40 µg per campione) sono stati separati su gel 4-12% Bis-Tris gels (NuPAGE®, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) insieme ad un marker proteico biotinilato. Dopo 2 ore di permanenza in TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) contenente 5% ECL di agente bloccante (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), le membrane sono state lavate con TBST e successivamente incubate (4°C, 18 ore) con un anticorpo primario. Dopo il lavaggio

le membrane sono state incubate (22°C, 1 ora) con un anticorpo secondario coniugato con HRP insieme ad un anticorpo anti-biotina. Le proteine legate all'anticorpo sono state visualizzate con ECL plus o con *Advanced western blotting detection system* (GE Healthcare) utilizzando l'*Image analysis system ChemidocXRS* (Biorad, Hercules, CA).

#### *Saggio della membrana corioallantoidea di pollo*

Uova di pollo “White Leghorn” fecondate sono state incubate in condizioni di umidità costante a 37°C secondo una tecnica precedentemente descritta in dettaglio (96). Al terzo giorno di incubazione si crea un'apertura nel guscio e sono rimossi 2-3 ml di albume in maniera tale da staccare la membrana corioallantoidea (CAM) in via di sviluppo dal guscio. L'apertura è stata sigillata con un vetrino di uguali dimensioni e le uova sono state riposte nell'incubatore. Le CAM sono state incubate all'ottavo giorno con i sopranatanti di HLMC, trattati con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) o NECA (10<sup>-5</sup> M), o con i sopranatanti degli HLM, trattati con hGX (3 µg/ml) o con hGX pretrattato con Me-Indoxam (10 µM), disciolti in 3 µl di DMEM ed assorbiti su spugne di gelatina sterili di 1 mm<sup>3</sup> (Gelfoam, Upjohn Company, Kalamazoo, MI). Le spugne contenenti il solo veicolo sono state utilizzate come controllo negativo, mentre le spugne contenenti 50 ng/embrione di VEGF-A<sub>165</sub> umano ricombinante sono state utilizzate come controllo positivo. In alcuni esperimenti, i sopranatanti di mastociti attivati sono stati preincubati con un anticorpo policlonale neutralizzante il VEGF-A (anti-VEGF-A di capra, 500 ng/embryo) (R&D Systems) o con anticorpi IgG come controllo isotipico (500 ng/ml) (Chemicon International,

Temecula, CA) prima dell'impianto. Le CAM sono state esaminate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio SR equipaggiato con Zeiss Camera System MC63. In alcuni esperimenti, i vasi sanguigni infiltranti le spugne sono stati contati in doppio cieco da due osservatori ad un ingrandimento 50x.

#### *Dosaggio della attività PLA<sub>2</sub>*

Gli HLMC sono stati risospesi in tampone PCG ( $2 \times 10^6$ /ml) e stimolati (15-120 min, 37°C) con anticorpo anti-IgE (0,03-1 µg/ml). L'attività PLA<sub>2</sub> nei sopranatanti delle colture degli HLMC è stata misurata come precedentemente descritto (97) mediante l'utilizzo di membrane di *Escherichia coli* radiomarcate con [<sup>3</sup>H]-AO in 50 mM Tris HCl (pH 7,4) e 10 mM CaCl<sub>2</sub> in un volume totale di 1 ml. La reazione è stata avviata con l'aggiunta di 0,1 µCi (97nmol) di membrane radiomarcate. Al termine dell'incubazione (90 min, 37°C), la reazione è stata fermata con l'aggiunta di 2 ml di metanolo, 1 ml di cloroformio e 50 µl di 9% acido formico. La frazione lipidica è stata estratta con la metodica di Bligh e Dyer (98) e successivamente separata mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice in fase mobile costituita da esano/etere etilico/acido formico (90/60/6, v/v). Il [<sup>3</sup>H]-AO sulla lastra è stato visualizzato mediante analisi del radiosegnale utilizzando uno *Bioscan System 200 Imaging Scanner* (Camberra Packard, Milano, Italia). L'area corrispondente al [<sup>3</sup>H]-AO è stata isolata ed il gel di silice grattato direttamente in *vials* per la misurazione della radioattività mediante scintillazione in

fase liquida (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer, Shelton, CT, USA). L'attività PLA<sub>2</sub> è stata calcolata ed espressa come pmoli di [<sup>3</sup>H]-AO idrolizzato/min/ml.

In esperimenti selezionati, al fine di caratterizzare l'attività PLA<sub>2</sub> nel sopranatante delle colture di mastociti polmonari, il sopranatante dei mastociti è stato preincubato (30 min, 37°C) con 10 mM DTT (agente che riduce i ponti disolfuro ed altera la struttura terziaria dell'enzima PLA<sub>2</sub>), 10 µM Me-Indoxam (inibitore sito-specifico di diverse sPLA<sub>2</sub>), 10 µM AZ-1 (inibitore specifico della hGIV PLA<sub>2</sub>) o 2 mM PMSF (inibitore della acetilidrolasi), e successivamente incubate (60 min, 37°C) con le membrane radiomarcate di *E. coli*. L'attività PLA<sub>2</sub> residua è stata quindi valutata come descritto precedentemente.

#### *Dosaggio dell'istamina*

L'istamina secreta nel sopranatante delle colture degli HLMC è stata dosata con una metodica immunoenzimatica competitiva (Immunotech, Marsiglia, Francia), secondo le istruzioni del produttore. Il contenuto cellulare totale di istamina è stato misurato in lisati cellulari ottenuti mediante cicli di congelamento e scongelamento. La percentuale della secrezione di istamina è stata calcolata secondo l'equazione  $(R-R_b)/(R_t-R_b) \times 100$ , dove R è la secrezione di istamina nei campioni stimolati, R<sub>b</sub> è la secrezione nei campioni non stimolati ed R<sub>t</sub> è il contenuto cellulare totale di istamina.

### *Analisi statistiche*

I risultati presentati rappresentano la media  $\pm$  ES. I dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student o il test ANOVA; quando necessario è stato utilizzato il *Duncan's new multiple range test* (99). La significatività è stata definita come  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### *Espressione dell'mRNA per i VEGF e PLGF nei mastociti umani*

In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA per i diversi membri della famiglia del VEGF negli HLMC, LAD-2 ed HMC-1. L'analisi dei prodotti della RT-PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio ha rilevato l'espressione di tre isoforme di VEGF-A (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-A<sub>189</sub>) e delle due isoforme di VEGF-B (VEGF-B<sub>167</sub> e VEGF-B<sub>186</sub>) in tutti i tipi di mastociti umani esaminati (Figura 1). Il rapporto VEGF-B<sub>186</sub>/VEGF-B<sub>167</sub> era  $0,47 \pm 0,05$  negli HLMC mentre risultava significativamente aumentato nelle cellule LAD-2 ( $1,32 \pm 0,14$ ;  $p < 0,05$ ) e nelle HMC-1 ( $4,73 \pm 0,77$ ;  $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). È opportuno sottolineare che l'espressione di mRNA per VEGF-C e VEGF-D, due mediatori dello sviluppo linfatico è stata rilevata in tutti i tipi di mastociti umani esaminati.

PlGF è altamente espresso a livello placentare (47) ed in alcuni tumori umani (48). L'espressione di mRNA per le due maggiori isoforme di PlGF (PlGF-1 e PlGF-2) è stata rilevata soltanto nelle HMC-1 e non nelle LAD-2 e negli HLMC (Figura 1).

### *Analisi del contenuto di VEGF-A e PlGF nei mastociti umani*

In una serie parallela di esperimenti abbiamo valutato l'espressione a livello proteico dei fattori angiogenici e linfoangiogenici nei mastociti umani. A tale scopo,

i mastociti sono stati lisati ed il contenuto totale di VEGF-A e PlGF immunoreattivo è stato misurato mediante ELISA. La concentrazione di VEGF-A negli HLMC, LAD-2 ed HMC-1 era di  $28,0 \pm 6,0$  pg/ $10^6$  cellule,  $105,0 \pm 17,0$  pg/ $10^6$  cellule e  $70,0 \pm 11,0$  pg/ $10^6$  cellule, rispettivamente (Figura 2). L'analisi dei livelli di PlGF immunoreattivo ha rilevato l'assenza di questa proteina in tutti i tipi di mastociti esaminati inclusi le HMC-1, che esprimevano il corrispondente mRNA (dati non mostrati).

#### *Analisi del contenuto di VEGF-B, VEGF-C, e VEGF -D nei mastociti umani*

Per verificare se i mastociti umani esprimessero a livello proteico gli altri membri della famiglia del VEGF (VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D) abbiamo utilizzato il western blot. Quando gli estratti proteici degli HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono stati incubati con un anticorpo anti-VEGF-B, una banda immunoreattiva di circa 20-22 kDa è stata rilevata in tutti e tre i tipi di mastociti umani esaminati (Figura 3A). Questa banda co-migrava con il VEGF-B<sub>167</sub> presente nella linea cellulare MCF-7 utilizzata come controllo positivo (100). Al contrario, nessuna banda immunoreattiva corrispondente all'isoforma VEGF-B<sub>189</sub> è stata evidenziata nei mastociti umani presi in esame.

Il VEGF-C e VEGF-D sono sintetizzati dopo che i loro precursori, conservati all'interno dei granuli citoplasmatici, sono sottoposti ad un complesso processo proteolitico (101, 102). Pertanto, abbiamo valutato l'espressione a livello proteico di VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani utilizzando specifici anticorpi diretti contro i loro precursori. Negli HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state evidenziate



bande immunoreattive di 58 kDa (Figura 3B) e 53 kDa (Figura 3C) che corrispondono rispettivamente ai precursori proteici di VEGF-C (101) e VEGF-D (102) ritrovati anche nella linea cellulare RAW 264.7 utilizzata come controllo positivo.

#### *Secrezione spontanea di VEGF-A e di PlGF dai mastociti umani*

In una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato la secrezione spontanea di VEGF-A e PlGF in condizioni basali dai mastociti. A tale scopo, HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state poste in coltura per 48 ore. Al termine del periodo di incubazione gli HLMC hanno rilasciato una piccola quantità di VEGF-A ( $\sim 40$  pg/ $10^6$  cellule) (Figura 4) mentre non è stato documentato alcun rilascio di PlGF (dati non mostrati). Le LAD-2 ed HMC-1 hanno rilasciato spontaneamente concentrazioni maggiori di VEGF-A ( $207 \pm 20$  pg/ $10^6$  cellule e  $181 \pm 40$  pg/ $10^6$  cellule, rispettivamente). E' interessante notare che le cellule HMC-1 pur esprimendo costitutivamente mRNA per PlGF-1/2, non rilasciano PlGF immunoreattivo.

#### *Effetto della PGE<sub>2</sub> sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani*

E' noto che la PGE<sub>2</sub> esercita effetti pro-oncogenici in diversi tumori (103, 104). E' stato, inoltre, dimostrato che la PGE<sub>2</sub> promuove la crescita tumorale attraverso il potenziamento dell'angiogenesi neoplastica (105). Pertanto, in una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato gli effetti della PGE<sub>2</sub> sulla

secrezione di VEGF-A dai mastociti umani. Negli HLMC la  $PGE_2$  induce un significativo incremento del rilascio di VEGF-A, rilevabile dopo 24 e 48 ore di stimolazione (Figura 5A). Nelle LAD-2 questo aumento risulta ancora più marcato (Figura 5B). Al contrario, nelle HMC-1 la  $PGE_2$  non incrementa la secrezione spontanea di VEGF-A in nessuno dei tempi esaminati durante la cinetica (Figura 5C).

#### *Effetti della $PGE_2$ sull'espressione di mRNA per i VEGF nei mastociti umani*

La secrezione di VEGF-A indotta dalla  $PGE_2$  nei mastociti richiede alcune ore di incubazione (>6h) suggerendo che possa essere necessaria la sintesi *de novo* della proteina. Pertanto, abbiamo esaminato, mediante RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), le cinetiche di espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D nelle cellule LAD-2 stimulate con  $PGE_2$ . La Figura 6 mostra le diverse cinetiche di espressione di mRNA per le varie forme di VEGF. L'espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C è rapidamente incrementata dopo 3 ore di incubazione dei mastociti con la  $PGE_2$  con un ritorno al valore basale dopo 6 ore. E' interessante notare che l'espressione di mRNA per il VEGF-B<sub>167</sub> raggiunge il massimo dopo 6 ore di incubazione per poi ridursi dopo 9 ore. Al contrario, l'espressione di mRNA per il VEGF-D non si modifica dopo stimolazione con  $PGE_2$ . Questi risultati indicano che la  $PGE_2$  induce la trascrizione di mRNA per il VEGF-A, VEGF-B e VEGF-C con differenti cinetiche di attivazione.

### *Effetti di un analogo dell'adenosina (NECA) sulla produzione di VEGF-A dai mastociti umani*

L'adenosina è un nucleoside purinico endogeno; dopo il suo rilascio dalla cellula o dopo la sua sintesi nell'ambiente extracellulare, può attivare specifici recettori (106, 107). E' noto che in alcune aree di tumori solidi è spesso presente uno stato di ipossia transitoria o cronica (108) riconducibile all'accumulo extracellulare di adenosina (109). Inoltre, è noto il ruolo di adenosina nell'asma e nelle malattie croniche ostruttive del polmone (65, 110). Pertanto, abbiamo ritenuto interessante esaminare gli effetti di NECA, un analogo metabolicamente stabile dell'adenosina, sulla secrezione di VEGF-A dai mastociti umani. La Figura 7 mostra che NECA ( $10^{-5}$  M) induce un marcato incremento della secrezione di VEGF-A dopo 12 ore di stimolazione delle HMC-1 raggiungendo il picco massimo dopo 24 ore. Analoghi risultati sono stati ottenuti con le HLMC-1 (dati non mostrati), mentre NECA non induce un rilascio di VEGF-A dalle LAD-2 (dati non mostrati).

### *Effetto di NECA sull'espressione di mRNA per i VEGF nei mastociti umani*

In una successiva serie di esperimenti abbiamo valutato, mediante la tecnica qRT-PCR, la cinetica di espressione di mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, -B<sub>167</sub>, -C e -D nelle HMC-1 stimulate con NECA ( $10^{-5}$  M). La Figura 8 mostra che l'espressione di mRNA per il VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C incrementava rapidamente dopo 3 ore di incubazione rimanendo stabile fino a 9 ore. L'espressione di mRNA per VEGF-D rimaneva inalterato per le prime 3 ore di incubazione con NECA per poi aumentare

progressivamente fino a 9 ore. Infine, NECA non modificava l'espressione di mRNA per VEGF-B<sub>167</sub>.

#### *Effetto dei sopranatanti dei mastociti umani sulla risposta angiogenica in vivo*

I risultati degli esperimenti precedenti dimostrano che i mastociti umani producono diversi fattori angiogenici in risposta ad agonisti fisiologici. In una serie di tre esperimenti abbiamo valutato la risposta angiogenica *in vivo* dei sopranatanti di mastociti attivati con PGE<sub>2</sub> e NECA utilizzando la membrana CAM dell'embrione di pollo (96). Nelle CAM di embrioni di pollo all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina imbevute di sopranatante di mastociti umani. Le spugne adsorbite con il tampone o con il VEGF-A<sub>165</sub> sono state utilizzate rispettivamente come controllo negativo o positivo. Al dodicesimo giorno di incubazione nessuna risposta vascolare è stata osservata attorno alle spugne trattate con il tampone (numero di vasi della spugna-CAM [NVSCB]=  $7 \pm 2$ ) (Figura 9A). Nelle spugne imbevute con i sopranatanti dei mastociti non stimolati tenuti in coltura per 24 ore, il NVSCB era  $16 \pm 4$  (Figura 9B). I sopranatanti degli HLMC attivati con PGE<sub>2</sub> o NECA per 24 ore inducevano una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici che si distribuivano radialmente attraverso la spugna (PGE<sub>2</sub> =  $25 \pm 3$  NVSCB; NECA =  $26 \pm 4$  NVSCB) (Figura 9C e 9D). Una simile risposta angiogenica è stata osservata macroscopicamente negli impianti trattati con 50 ng di VEGF-A<sub>165</sub> (NVSCB =  $28 \pm 4$ ) (dati non mostrati). Per valutare se la risposta angiogenica indotta dai sopranatanti dei mastociti fosse in parte dovuta al loro contenuto di VEGF-A, i sopranatanti attivati con la PGE<sub>2</sub> e

NECA sono stati preincubati con un anticorpo anti-VEGF-A e successivamente aggiunti alla CAM. La preincubazione con un anticorpo anti-VEGF-A riduceva in maniera significativa la risposta angiogenica dei mastociti ( $\text{PGE}_2 = 17 \pm 3$  NVSCB; NECA =  $18 \pm 3$ ;  $p < 0,001$  vs. i sopranatanti di mastociti attivati con  $\text{PGE}_2$  e NECA) (Figura 9E e 9F). L'incubazione dei mastociti con il controllo isotipico non influenzava la risposta angiogenica (dati non mostrati). Questi risultati indicano che i sopranatanti dei mastociti umani inducono una risposta angiogenica *in vivo* che è maggiormente dovuta alla presenza del VEGF-A.

#### *Espressione di varie isoforme di sPLA<sub>2</sub> nei mastociti umani*

Le PLA<sub>2</sub> sono enzimi che catalizzano l'idrolisi dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. In particolare, le sPLA<sub>2</sub> vengono prodotte e secrete in elevate quantità da diversi tipi di cellule immunocompetenti (68) sia nel circolo ematico che nei tessuti durante condizioni infiammatorie. Queste molecole a loro volta sono in grado di evocare nelle cellule residenti la degranulazione e la produzione di citochine e chemochine in grado di modulare ulteriormente la risposta immune (85). Recenti evidenze indicano che le sPLA<sub>2</sub> possono partecipare al mantenimento e allo sviluppo dei tumori sostenendo la sintesi di mediatori angiogenici e linfoangiogenici. Pochi dati vi sono sull'espressione delle sPLA<sub>2</sub> nei mastociti umani. Pertanto nella seconda parte di questo studio abbiamo voluto verificare se i mastociti umani fossero una fonte di sPLA<sub>2</sub>.

A tale scopo abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA specifico per le diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> da parte dei mastociti mediante RT-PCR. I risultati di

questi esperimenti dimostrano che due diverse preparazioni di HLMC esprimono livelli significativi di mRNA per la sPLA<sub>2</sub> di gruppo hGIB (341 bp), hGIIA (434 bp), hGIID (294 bp), hGIIE (120 bp), hGIIF (211 bp), hGIII (500 bp), hGV (358 bp), hGX (370 bp), hGXIIA (105 bp) and hGXIIIB (141 bp) (Figura 10). Le LAD-2 invece esprimono molte isoforme di sPLA<sub>2</sub> ad esclusione della hIB e della hGX (Figura 10). Questi dati suggeriscono che *in vivo* i mastociti potrebbero rappresentare una fonte primaria di sPLA<sub>2</sub>.

#### *Effetti dell'attivazione immunologica sulla secrezione di sPLA<sub>2</sub> da parte dei mastociti polmonari umani*

In un successivo gruppo di esperimenti abbiamo valutato se i mastociti, oltre ad esprimere le sPLA<sub>2</sub>, fossero in grado di secernere questi enzimi in seguito ad attivazione immunologica. L'anticorpo anti-IgE rappresenta uno stimolo in grado di attivare i mastociti ed indurre in essi secrezione dei granuli citoplasmatici e processi di trascrizione genica mediante il *cross-linking* delle IgE legate *in vivo* ai recettori Fcε presenti sulla superficie cellulare. Gli HLMC sono stati stimolati (30 min, 37°C) con concentrazioni crescenti di anti-IgE (0,03-3 µg/ml), secondo un protocollo sperimentale che si è dimostrato efficace nell'indurre l'attivazione cellulare e la secrezione di istamina. La Figura 11 mostra che l'attivazione immunologica degli HLMC era in grado di indurre dalle cellule la secrezione di una attività PLA<sub>2</sub> in maniera concentrazione-dipendente. La secrezione della PLA<sub>2</sub> risultava significativa alla concentrazione di anti-IgE di 0,3 µg/ml ( $58,81 \pm 5,22$

pmoli di [ $^3\text{H}$ ]-AO /min/ml) e raggiungeva il massimo alla concentrazione di 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $78,56 \pm 5,68$  pmoli di [ $^3\text{H}$ ]-AO /min/ml).

Per determinare quale famiglia delle PLA<sub>2</sub> potesse essere secreta dai mastociti attivati immunologicamente, abbiamo studiato gli effetti di alcuni inibitori farmacologici sull'attività PLA<sub>2</sub>. Il sopranatante dei mastociti, precedentemente attivati dall'anti-IgE, è stato incubato (30 min, 37°C) con concentrazioni ottimali di inibitori farmacologici di diverse forme di PLA<sub>2</sub>: 10 mM DTT, 10  $\mu\text{M}$  Me-Indoxam, 10  $\mu\text{M}$  AZ-1 (inibitore della cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ), 2 mM PMSF. Al termine dell'incubazione, l'attività PLA<sub>2</sub> residua nel sopranatante è stata valutata in un saggio enzimatico su membrane di *Escherichia coli*. La Figura 12 mostra che l'agente riducente, DTT, e l'inibitore sito-specifico di diverse sPLA<sub>2</sub>, Me-Indoxam, erano in grado di inibire quasi completamente l'attività PLA<sub>2</sub> presente nel sopranatante dei mastociti. Al contrario, il PMSF e l'AZ-1 non avevano effetto sulla capacità di idrolizzare l'AO dai fosfolipidi delle membrane batteriche. Questi dati suggeriscono che l'attività PLA<sub>2</sub> presente nel sopranatante dei mastociti attivati sia dovuta ad una sPLA<sub>2</sub> ed escludevano un contributo, anche parziale dell'acetilidrolasi secreta e della cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , eventualmente liberata nel sopranatante in seguito a lisi cellulare.

Per valutare la cinetica della secrezione delle sPLA<sub>2</sub>, in una seconda serie di esperimenti abbiamo stimolato gli HLMC con una concentrazione ottimale di anti-IgE (1  $\mu\text{g/ml}$ ) per tempi di incubazione differenti (15-120 min). Come mostrato nella Figura 13, la stimolazione degli HLMC induceva la rapida secrezione della PLA<sub>2</sub> nel sopranatante con una cinetica che raggiungeva un *plateau* a circa 30

minuti. È interessante osservare che la cinetica della secrezione della PLA<sub>2</sub> da parte degli HLMC procedeva parallelamente a quella della istamina ( $t_{1/2}$  del rilascio di sPLA<sub>2</sub>:  $15,3 \pm 3,2$  min;  $t_{1/2}$  del rilascio di istamina:  $12,8 \pm 2,6$  min), misurata negli stessi campioni con metodica immunoenzimatica ed espressa come percentuale del contenuto cellulare totale (Figura 13). Questi dati suggeriscono che l'enzima PLA<sub>2</sub> secreto da parte dei mastociti inseguito all'attivazione immunologica fosse già presente, preformato, all'interno delle cellule. Inoltre, l'andamento parallelo delle cinetiche della secrezione della PLA<sub>2</sub> e dell'istamina in seguito all'attivazione con anti-IgE fa ipotizzare che la secrezione delle due molecole avviene simultaneamente.

Abbiamo, quindi, valutato l'esistenza di una correlazione tra la secrezione di istamina e quella della sPLA<sub>2</sub> da parte degli HLMC stimolati (30 min, 37°C) con una dose ottimale di anti-IgE (1 µg/ml). L'osservazione dell'esistenza di una correlazione statisticamente significativa ( $r=0,732$ ;  $p<0,024$ ) tra la secrezione di istamina e la secrezione di PLA<sub>2</sub> suggeriva che la PLA<sub>2</sub> avesse la stessa localizzazione intracitoplasmatica dell'istamina, ovvero fosse contenuta nei granuli secretori (dati non mostrati).

#### *Effetto della hGIIA e della hGX sulla secrezione di VEGF-A e VEGF-C dai macrofagi polmonari umani*

I macrofagi svolgono un ruolo primario nell'immunità innata, nell'infiammazione tessutale, nel rimodellamento e nell'angiogenesi producendo una varietà di citochine e mediatori proinfiammatori. I macrofagi sono le cellule



immunitarie predominanti nei siti di infiammazione e nei siti tumorali dove vengono denominati TAM (macrofagi associati al tumore) (111). I TAM inducono angiogenesi attraverso la secrezione di diversi mediatori: TNF- $\alpha$ , urochinasi, angiogenina e VEGF (112). Anche mastociti si accumulano nei siti tumorali ed i loro mediatori (istamina, bFGF, VEGF ecc.) promuovono angiogenesi. Molti gruppi di lavoro hanno dimostrato che vi è una stretta interazione macrofagi-mastociti nei siti d'infiammazione e nei tumori (24, 25). Fawcett (113) ha dimostrato che i macrofagi *in vivo*, una volta reclutati nei siti di degranulazione mastocitaria, fagocitano i mediatori mastocitari attivandosi. Dati ottenuti nel nostro laboratorio dimostrano che le sPLA<sub>2</sub> attivano i macrofagi inducendone l'esocitosi e la produzione di citochine e chemochine (85). Pertanto, in questa serie successiva di esperimenti abbiamo valutato se le sPLA<sub>2</sub>, prodotte dai mastociti, fossero in grado di indurre nei macrofagi la secrezione di fattori angiogenici e linfoangiogenici. Gli HLM sono stati incubati (3-48 ore, 37°C) con concentrazioni crescenti di due isoforme di sPLA<sub>2</sub> coinvolte nello sviluppo tumorale, la gruppo hGIIA e hGX. I risultati di questi esperimenti indicano che la hGIIA e hGX inducono un aumento significativo della secrezione di VEGF-A e VEGF-C (Figura 14-15). La secrezione di VEGF-A e VEGF-C dagli HLM è tempo-dipendente. In particolare, la secrezione di VEGF-A indotta dalla hGX è rilevabile dopo 12-24 ore di incubazione e persiste ancora dopo 48 ore, mentre quella del VEGF-C è significativa dopo già 6 ore, raggiunge un picco a 24 ore, riducendosi progressivamente a 48 ore (Figura 16).

### *Effetto di hGX sull'espressione di mRNA per i VEGF nei macrofagi polmonari umani*

I risultati precedenti mostrano che il VEGF-A e il VEGF-C seguono due cinetiche di secrezione diverse. Pertanto, in una serie successiva di esperimenti abbiamo voluto esaminare se questo evento fosse legato ad una diversa cinetica di espressione dell'mRNA mediante qRT-PCR. L'espressione dell'mRNA per il VEGF-A e VEGF-C, indotta dalla hGX, raggiunge un massimo a 3 ore, si riduce progressivamente a 6 ore e ritorna a valori basali dopo 18 ore di stimolazione (Figura 17). Questi dati indicano che la trascrizione genica del il VEGF-A e VEGF-C sono paragonabili e quindi è lecito pensare che il diverso *time course* di secrezione sia correlato a differenze nei meccanismi di trasporto e secrezione della proteina stessa.

### *Effetto dei sopranatanti dei macrofagi umani sulla risposta angiogenica in vivo*

I risultati degli esperimenti precedenti dimostrano che i macrofagi producono *in vitro* diversi fattori angiogenici in risposta alle sPLA<sub>2</sub>. Pertanto anche in queste cellule abbiamo valutato l'effetto dei sopranatanti degli HLM trattati con la hGX sulla risposta angiogenica *in vivo* utilizzando le CAM di embrioni di pollo (96). Nelle CAM all'ottavo giorno di incubazione sono state impiantate spugne di gelatina imbevute di sopranatante degli HLM. Al dodicesimo giorno di incubazione nessuna risposta vascolare è stata osservata attorno alle spugne trattate con il tampone (NVSCB=  $7 \pm 2$ ) (Figura 18A). Nelle spugne imbevute con i sopranatanti dei macrofagi non stimolati tenuti in coltura

per 24 ore, il NVSCB era  $14 \pm 4$  (Figura 18B), al contrario, i sopranatanti degli HLM attivati con hGX inducevano una risposta angiogenica caratterizzata dalla presenza di vasi allantoici che si distribuivano radialmente attraverso la spugna (NVSCB =  $32 \pm 5$ ) (Figura 18C). Questa risposta angiogenica *in vivo* è proprio dovuta all'attività delle sPLA<sub>2</sub>, in quanto nelle spugne imbevute con sopranatanti degli HLM stimolati con la hGX pretrattata con Me-Indoxam la risposta vascolare tornava ai livelli del controllo con un NVSCB di  $15 \pm 3$  (Figura 18D). Questi risultati indicano che i sopranatanti dei macrofagi inducono una risposta angiogenica *in vivo* che è presumibilmente dovuta alla presenza del VEGF-A indotto dalla stimolazione con le sPLA<sub>2</sub>.

## DISCUSSIONE

I mastociti sono cellule secretorie multifunzionali particolarmente abbondanti a livello delle superfici di contatto tra l'organismo e l'ambiente esterno. Queste cellule agiscono come sentinelle e sono probabilmente le prime, insieme ai macrofagi, ad intervenire nelle risposte infiammatorie e nell'immunità innata contro agenti infettivi di tipo virale e batterico (20). Molteplici evidenze sperimentali hanno documentato l'importanza dei mastociti in diversi processi infiammatori cronici (6) e nello sviluppo tumorale (26, 28, 62). L'infiltrazione dei mastociti nella lesione tumorale è strettamente correlata ai fenomeni dell'angiogenesi e della linfoangiogenesi ed allo sviluppo di metastasi (34-38). L'esatto meccanismo attraverso il quale i tumori inducono angiogenesi è ancora sconosciuto. Negli ultimi anni, il ruolo della famiglia del VEGF emerge sempre di più nei meccanismi di regolazione dell'angiogenesi, della linfoangiogenesi e del rimodellamento tessutale in corso di patologie infiammatorie e neoplastiche (41, 45).

In questo studio abbiamo identificato un nuovo meccanismo attraverso il quale i mastociti umani normali e di pazienti con mastocitosi modulano l'angiogenesi, la linfoangiogenesi e l'infiammazione attraverso la sintesi ed il rilascio di diverse forme di VEGF. Inoltre, abbiamo dimostrato che i mastociti partecipano anche indirettamente a questi processi in quanto alcuni mediatori mastocitari, in particolare le sPLA<sub>2</sub>, attivano i macrofagi inducendo la secrezione di fattori proangiogenici.

Esistono diversi modelli *in vitro* per lo studio della biologia dei mastociti umani. I mastociti primari purificati da tessuto umano, tra cui i mastociti ottenuti dal tessuto polmonare (HLMC) rappresentano probabilmente il modello che più fedelmente riproduce le condizioni *in vivo*. Tuttavia, le difficoltà tecniche di ottenere un numero di cellule sufficiente per esperimento *in vitro* ostacolano un esteso utilizzo di questo eccellente modello sperimentale. La linea di mastociti umani di origine leucemica HMC-1 viene spesso utilizzata per studiare la biologia mastocitaria. Questa linea cellulare indifferenziata è stata spesso utilizzata per valutare gli aspetti angiogenici dei mastociti umani (63-65). Tuttavia, le cellule HMC-1 sono prive di alcuni aspetti fenotipici e biologici caratteristici dei mastociti umani normali. In particolare, queste cellule non esprimono i recettori ad alta affinità per le IgE (67). Più recentemente, è stata sviluppata, da un paziente affetto da mastocitosi, la linea mastocitaria LAD-2. Le LAD-2 sono cellule altamente differenziate che presentano notevoli somiglianze con le colture primarie di mastociti umani derivanti dalle cellule CD34<sup>+</sup> (66). Infatti, l'espressione di alcuni markers di superficie (CD4, CD9, CD13, CD22, CD45, CD64, CD71, CD103, CD117, CD132, CCR5 e CXCR4), di mediatori e recettori FcεRI e FcγRI rendono questa linea idonea per lo studio dei mastociti. Al fine di approfondire le attuali conoscenze sul possibile ruolo dei mastociti umani nell'ambito dell'angiogenesi e della linfoangiogenesi, il presente studio è stato condotto con tutti e tre i tipi di mastociti umani: HLMC, HMC-1 e LAD-2.

I mastociti umani del parenchima polmonare, le cellule LAD-2 e le HMC-1 esprimono costitutivamente mRNA per le principali isoforme di VEGF-A (121, 165

e 189) e per le due isoforme di VEGF-B (167 e 186) che svolgono un ruolo fondamentale nell'angiogenesi (41). Inoltre, i tre tipi di mastociti umani esaminati esprimono costitutivamente mRNA per VEGF-C e VEGF-D che regolano lo sviluppo dei vasi linfatici (45). Questi risultati confermano ed estendono alle cellule HLMC e LAD-2 le osservazioni precedentemente ottenute da altri studi sulle HMC-1 e/o sui mastociti derivati da cellule del cordone ombelicale (CBMC) (61, 63, 64). L'mRNA per le due isoforme di PlGF-1 e -2 è stato rilevato solo nelle cellule HMC-1. E' interessante segnalare che mRNA per PlGF è stato precedentemente riscontrato in linee di mastociti murini (62). Pertanto questi ultimi risultati ampliano le significative differenze tra i diversi tipi di mastociti umani e tra mastociti umani e murini.

A livello proteico il VEGF-A è contenuto in concentrazioni significativamente diverse nei tre tipi di mastociti umani valutati. Le proteine per VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D sono state rilevate mediante Western blot nei lisati cellulari dei tre tipi di mastociti esaminati. In particolare, l'espressione e la sintesi di VEGF-C e VEGF-D nei mastociti supporta l'ipotesi che queste cellule, localizzate in prossimità dei vasi ematici e linfatici (114, 115) possano svolgere un ruolo significativo nella linfoangiogenesi attraverso la produzione di fattori che promuovono lo sviluppo dei vasi linfatici. Infine, PlGF immunoreattivo non è stato rilevato nei mastociti umani e/o nei loro sopranatanti. Ciò apparentemente contrasta con l'osservazione che le cellule HMC-1 esprimono costitutivamente mRNA per PlGF-1 and -2.

In questo studio abbiamo dimostrato che i mastociti umani secernono spontaneamente VEGF-A durante un periodo di 6 – 48 ore. La secrezione spontanea

di VEGF-A risulta più elevata nelle LAD-2 ed HMC-1 rispetto agli HLMC. Questa ultima osservazione potrebbe aggiungersi alle differenze precedentemente riportate sulla secrezione spontanea di VEGF-A nelle HMC-1, CBMC e BMMC (61, 63). Abbiamo anche dimostrato che i sopranatanti di mastociti non stimolati esercitano una risposta angiogenica *in vivo*. Il significato biologico e fisiopatologico del rilascio spontaneo di fattori angiogenici da parte dei mastociti rimane da chiarire.

Molteplici studi indicano che la  $PGE_2$  è un importante mediatore proinfiammatorio, rilevante nella crescita tumorale (103, 104). Per tale motivo abbiamo esaminato la cinetica dell'espressione delle diverse forme di VEGF in mastociti umani stimolati con la  $PGE_2$ . Abbiamo dimostrato che la  $PGE_2$  è un potente stimolo per la produzione di VEGF-A nelle cellule LAD-2 ed HLMC, ma non nelle HMC-1. La secrezione di VEGF-A indotta dalla  $PGE_2$  richiede la sintesi *de novo* della proteina. Infatti, ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la  $PGE_2$  induce l'aumento dell'espressione dell'mRNA per diversi membri della famiglia del VEGF con differenti cinetiche. La trascrizione del VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C indotta dalla  $PGE_2$  raggiungeva rapidamente livelli significativi mentre l'espressione di mRNA per VEGF-B<sub>167</sub> iniziava più tardivamente. È interessante sottolineare che la  $PGE_2$  non induce un aumento dell'espressione per il VEGF-D. Questi dati suggeriscono che la  $PGE_2$  potrebbe svolgere un ruolo importante nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi.

E' noto che in alcune aree tumorali si verifica una transitoria o cronica ipossia (108) che può condurre all'accumulo extracellulare di adenosina (109). E' stato ampiamente dimostrato che l'adenosina svolge un ruolo rilevante nei meccanismi

patogenetici dell'asma bronchiale e delle malattie croniche ostruttive del polmone (110). Pertanto, abbiamo esaminato la cinetica degli effetti di un analogo stabile dell'adenosina (NECA) sulla secrezione e sull'espressione di mRNA per i VEGF nei differenti tipi di mastociti umani utilizzati. NECA induce un rapido e duraturo incremento della trascrizione di VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C mentre l'aumento dell'espressione di VEGF-D è più tardivo. Viceversa l'espressione di VEGF-B<sub>167</sub> non è apparentemente inducibile da NECA. Questi risultati dimostrano che un analogo dell'adenosina è un potente induttore dell'espressione di VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D suggerendo che l'adenosina possa essere un modulatore importante non soltanto nell'angiogenesi, ma anche nella linfoangiogenesi.

Gli esperimenti suddetti dimostrano che PGE<sub>2</sub> e NECA modulano in maniera differente l'espressione dei diversi membri della famiglia del VEGF indicando in maniera diversa la trascrizione delle varie forme di VEGF. Queste osservazioni implicano che i fattori prodotti e secreti dai mastociti potrebbero intervenire in tempi diversi nella regolazione del complesso processo di angiogenesi e linfoangiogenesi nell'ambito di patologie infiammatorie e neoplastiche.

I mastociti sono strategicamente localizzati in prossimità dei vasi sanguigni e linfatici (115) e risultano aumentati in diversi tumori umani (29, 30, 32). La loro presenza è correlata all'angiogenesi ed alla formazione di metastasi (36, 38, 96). Pertanto, la produzione (spontanea ed indotta) dei fattori angiogenici e linfoangiogenici dai mastociti umani potrebbe contribuire all'angiogenesi ed alla linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica. Questa ipotesi è supportata dai risultati ottenuti nel modello *in vivo* dell'angiogenesi della CAM. In effetti, i



sopranatanti di mastociti non stimolati e/o attivati con la PGE<sub>2</sub> ed il NECA inducono una risposta angiogenica parzialmente inibita da un anticorpo anti-VEGF-A.

Le PLA<sub>2</sub> secretorie (sPLA<sub>2</sub>) sono enzimi contenuti nei granuli citoplasmatici di diverse cellule immunitarie (68), e sono secreti nell'ambiente extracellulare dove trovano le concentrazioni di calcio millimolari necessarie per la loro attivazione. Elevati livelli di sPLA<sub>2</sub> sono stati rilevati nel plasma di pazienti affetti da malattie infiammatorie sistemiche, nelle sedi locali di infiammazione e in diversi tumori. Recenti evidenze indicano che le sPLA<sub>2</sub> possono partecipare al mantenimento e allo sviluppo dei tumori sostenendo la sintesi di mediatori angiogenici e linfoangiogenici. E' stato descritto che i mastociti murini esprimono diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> (90), mentre a causa del numero limitato di cellule pochi dati vi sono sull'espressione di queste molecole in mastociti umani. In considerazione di quanto appena esposto, un ulteriore interessante osservazione di questo studio è quella che i mastociti polmonari e le LAD-2 sintetizzano diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> (hGIB, hGIIA, hGIID, hGIIE, hGIIF, hGIIL, hGV, hGX, hGXIIA e hGXIIIB) e ne liberano elevate quantità nell'ambiente extracellulare in seguito all'attivazione immunologica. Questi dati sono di notevole importanza se si considera che fino ad oggi non è stata ancora caratterizzata l'origine cellulare di questo enzima a livello polmonare. E' stato precedentemente dimostrato che i mastociti murini esprimono le sPLA<sub>2</sub> e che in queste cellule l'enzima è localizzato all'interno dei granuli citoplasmatici. I nostri dati sembrano confermare questa osservazione anche nei mastociti polmonari. Infatti, la cinetica di secrezione della sPLA<sub>2</sub>, da parte dei

mastociti attivati con anti-IgE, è estremamente rapida e procede parallelamente a quella dell'istamina suggerendo che le sPLA<sub>2</sub> sono mediatori preformati localizzati insieme all'istamina all'interno dei granuli citoplasmatici dei mastociti. Inoltre, esiste una correlazione significativa tra la percentuale di istamina secreta e l'attività PLA<sub>2</sub> misurabile nel sopranatante dei mastociti. L'inibizione quasi completa dell'attività PLA<sub>2</sub> presente nei sopranatanti dei mastociti da parte di due inibitori specifici delle PLA<sub>2</sub> secretorie suggerisce che l'attività misurata è di una o più isoforme di sPLA<sub>2</sub> ed esclude, almeno in questo modello, un contributo dell'acetilidrolasi, altro membro della famiglia delle PLA<sub>2</sub>.

E' stato ampiamente dimostrato che molti tumori sono accompagnati da infiltrazioni di cellule infiammatorie, quali macrofagi, mastociti, eosinofili ecc (24). Negli ultimi anni, il possibile ruolo dei macrofagi e dei mastociti nello sviluppo dell'angiogenesi tumorale è stato profondamente rivalutato. I macrofagi associati ai tumori (TAM), si accumulano nelle aree poco vascolarizzate, necrotiche ed ipossiche dove si attivano inducendo la secrezione di numerosi mediatori tra i quali VEGF e bFGF, TNF- $\alpha$ , metallo proteasi ecc. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che i macrofagi ed i mastociti nei siti di infiammazione e nelle aree tumorali cooperano attivamente tra di loro. Infatti, la degranulazione mastocitaria genera il rilascio di numerose molecole infiammatorie che attivano direttamente molti tipi cellulari, tra i quali i macrofagi (24, 25). Ad esempio, l'istamina up-regola la sintesi di IL-1 e di IL-6 dai macrofagi (24). Come dimostrato in precedenza le sPLA<sub>2</sub> sono enzimi contenuti nei granuli mastocitari. Esperimenti condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato che le sPLA<sub>2</sub> attivano l'esocitosi e la

sintesi di citochine dai macrofagi polmonari umani (85). In questo studio abbiamo fornito l'evidenza che i mastociti sono fonte cellulare di sPLA<sub>2</sub> che attivano la produzione di fattori angiogenici e linfoangiogenici dai HLM. Questa evidenza deriva da fatto che due isoforme di sPLA<sub>2</sub> (hGIIA e hGX), sono in grado di indurre la secrezione di VEGF-A e VEGF-C dai macrofagi. La secrezione di VEGF-A indotta dalle sPLA<sub>2</sub> è tempo dipendente e richiede la sintesi *de novo* della proteina. Infatti, ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la hGX induce l'aumento dell'espressione dell'mRNA per il VEGF-A e VEGF-C. La trascrizione del VEGF-A<sub>165</sub> e VEGF-C indotta dalla hGX raggiungeva rapidamente livelli significativi, riducendosi progressivamente a 6 ore e ritornando a valori basali dopo 18 ore di stimolazione. Inoltre, i sopranatanti degli HLM attivati con hGX inducevano una risposta angiogenica *in vivo*, presumibilmente dovuta alla presenza del VEGF-A indotto dalla stimolazione con le sPLA<sub>2</sub>. Questa evidenza deriva dall'osservazione, che concentrazioni farmacologiche di Me-Indoxam sono in grado di inibire quasi completamente la risposta vascolare ottenuta dai sopranatanti dei macrofagi stimolati con la hGX.

I risultati di questo studio dimostrano che i mastociti sono cellule che svolgono un ruolo primario nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica attraverso due meccanismi: il primo, diretto, avviene attraverso la produzione di fattori angiogenici; il secondo, di tipo indiretto, si esplica attraverso il reclutamento dei macrofagi, le principali cellule infiltranti le aree di infiammazione cronica e di crescita neoplastica (Immagine). In aggiunta, risulta evidente che i mastociti neoplastici (HMC-1) ed in misura minore i mastociti derivati da pazienti

con mastocitosi (LAD-2), hanno numerose differenze biochimiche e funzionali rispetto alle colture primarie di mastociti tissutali.

In conclusione, questi studi aiutano a chiarire i meccanismi fondamentali di angiogenesi e linfoangiogenesi, ed il coinvolgimento di questi processi nell'infiammazione e nei tumori, malattie in cui i mastociti ed i macrofagi giocano un ruolo importante. Infine, il nostro studio suggerisce l'esistenza di potenziali strategie per intervenire sull'angiogenesi e sulla linfoangiogenesi attraverso la regolazione della produzione di fattori proangiogenici da parte dei mastociti e dei macrofagi umani.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vyas, H., and G. Krishnaswamy. 2006. Paul Ehrlich's "Mastzellen"--from aniline dyes to DNA chip arrays: a historical review of developments in mast cell research. *Methods Mol Biol* 315:3-11.
2. Crivellato, E., C. Beltrami, F. Mallardi, and D. Ribatti. 2003. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol* 123:19-21.
3. Agis, H., M. Willheim, W. R. Sperr, A. Wilfing, E. Kromer, E. Kabrna, E. Spanblochl, H. Strobl, K. Geissler, A. Spittler, G. Boltz-Nitulescu, O. Majdic, K. Lechner, and P. Valent. 1993. Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Ly<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD17<sup>-</sup>, colony-forming cell. *J Immunol* 151:4221-4227.
4. Fodinger, M., G. Fritsch, K. Winkler, W. Emminger, G. Mitterbauer, H. Gadner, P. Valent, and C. Mannhalter. 1994. Origin of human mast cells: development from transplanted hematopoietic stem cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 84:2954-2959.
5. Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, T. Semere, B. Foster, L. M. Scott, and D. D. Metcalfe. 1999. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 94:2333-2342.

6. Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimaldeston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23:749-786.
7. Kitamura, Y. 1989. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 7:59-76.
8. Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol Rev* 77:1033-1079.
9. Otsu, K., T. Nakano, Y. Kanakura, H. Asai, H. R. Katz, K. F. Austen, R. L. Stevens, S. J. Galli, and Y. Kitamura. 1987. Phenotypic changes of bone marrow-derived mast cells after intraperitoneal transfer into W/W<sup>v</sup> mice that are genetically deficient in mast cells. *J Exp Med* 165:615-627.
10. Galli, S. J., M. Grimaldeston, and M. Tsai. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8:478-486.
11. Metz, M., and M. Maurer. 2007. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 28:234-241.
12. Marone, G., M. Triggiani, A. Genovese, and A. D. Paulis. 2005. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* 88:97-160.
13. Krishnaswamy, G., O. Ajitawi, and D. S. Chi. 2006. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 315:13-34.
14. Stassen, M., L. Hultner, and E. Schmitt. 2002. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev Immunol* 22:115-140.

15. Vliagoftis, H., A. S. Worobec, and D. D. Metcalfe. 1997. The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *J Allergy Clin Immunol* 100:435-440.
16. Horny, H. P., K. Sotlar, and P. Valent. 2007. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* 74:121-132.
17. Kitamura, Y., and S. Go. 1979. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood* 53:492-497.
18. Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka. 1978. Decrease of mast cells in W/W<sup>v</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52:447-452.
19. Galli, S. J., M. Maurer, and C. S. Lantz. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11:53-59.
20. Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
21. Frandji, P., C. Tkaczyk, C. Oskeritzian, B. David, C. Desaymard, and S. Mecheri. 1996. Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26:2517-2528.
22. Poncet, P., M. Arock, and B. David. 1999. MHC class II-dependent activation of CD4<sup>+</sup> T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *J Leukoc Biol* 66:105-112.
23. Marshall, J. S. 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 4:787-799.
24. Li, Y., T. D. Nguyen, A. C. Stechschulte, D. J. Stechschulte, and K. N. Dileepan. 1998. Effect of mast cell granules on the gene expression of nitric

- oxide synthase and tumour necrosis factor-alpha in macrophages. *Mediators Inflamm* 7:355-361.
25. Tataroglu, C., A. Kargi, S. Ozkal, N. Esrefoglu, and A. Akkoclu. 2004. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). *Lung Cancer* 43:47-54.
  26. Theoharides, T. C., and P. Conti. 2004. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol* 25:235-241.
  27. Dawicki, W., and J. S. Marshall. 2007. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol* 19:31-38.
  28. Coussens, L. M., and Z. Werb. 2001. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* 193:F23-26.
  29. Acikalin, M. F., U. Oner, I. Topcu, B. Yasar, H. Kiper, and E. Colak. 2005. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig Liver Dis* 37:162-169.
  30. Chan, J. K., A. Magistris, V. Loizzi, F. Lin, J. Rutgers, K. Osann, P. J. DiSaia, and M. Samoszuk. 2005. Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 99:20-25.
  31. Ribatti, D., A. Vacca, R. Ria, A. Marzullo, B. Nico, R. Filotico, L. Roncali, and F. Dammacco. 2003. Neovascularisation, expression of fibroblast growth factor-2, and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with



- pathological progression in human malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:666-674.
32. Welsh, T. J., R. H. Green, D. Richardson, D. A. Waller, K. J. O'Byrne, and P. Bradding. 2005. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23:8959-8967.
  33. Kessler, D. A., R. S. Langer, N. A. Pless, and J. Folkman. 1976. Mast cells and tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 18:703-709.
  34. Aoki, M., R. Pawankar, Y. Niimi, and S. Kawana. 2003. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int Arch Allergy Immunol* 130:216-223.
  35. Iamaroon, A., S. Pongsiriwet, S. Jittidecharaks, K. Pattanaporn, S. Prapayasadok, and S. Wanachantararak. 2003. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32:195-199.
  36. Kondo, K., M. Muramatsu, Y. Okamoto, D. Jin, S. Takai, N. Tanigawa, and M. Miyazaki. 2006. Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. *J Surg Oncol* 93:36-42; discussion 42-33.
  37. Ribatti, D., E. Crivellato, A. M. Roccaro, R. Ria, and A. Vacca. 2004. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. *Clin Exp Allergy* 34:1660-1664.

38. Takanami, I., K. Takeuchi, and M. Naruke. 2000. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88:2686-2692.
39. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
40. Oliver, G., and K. Alitalo. 2005. The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:457-483.
41. Ferrara, N. 2007. Vascular endothelial growth factor: pathophysiology and clinical implications. *In Angiogenesis from basic science to clinical applications* N. Ferrara, ed. CRC,.
42. de Paulis, A., N. Prevete, I. Fiorentino, F. W. Rossi, S. Staibano, N. Montuori, P. Ragno, A. Longobardi, B. Liccardo, A. Genovese, D. Ribatti, A. F. Walls, and G. Marone. 2006. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol* 177:7322-7331.
43. Tammela, T., B. Enholm, K. Alitalo, and K. Paavonen. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65:550-563.
44. Alitalo, K., T. Tammela, and T. V. Petrova. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438:946-953.
45. Haiko, P. I., M. J. Karkkainen, M. G. Achen, A. Stacker, and A. K. 2007. Growth factors and lymphangiogenesis. *In Angiogenesis from basic science to clinical applications*. N. Ferrara, ed. CRC.
46. Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo. 1999. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10:528-535.

47. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M. G. Persico. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9267-9271.
48. Viglietto, G., D. Maglione, M. Rambaldi, J. Cerutti, A. Romano, F. Trapasso, M. Fedele, P. Ippolito, G. Chiappetta, G. Botti, and et al. 1995. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 11:1569-1579.
49. Cao, Y., W. R. Ji, P. Qi, A. Rosin, and Y. Cao. 1997. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 235:493-498.
50. De Falco, S., B. Gigante, and M. G. Persico. 2002. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 12:241-246.
51. Robinson, C. J., and S. E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114:853-865.
52. Folkman, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-18.
53. Danese, S., M. Sans, C. de la Motte, C. Graziani, G. West, M. H. Phillips, R. Pola, S. Rutella, J. Willis, A. Gasbarrini, and C. Fiocchi. 2006. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 130:2060-2073.

54. Baluk, P., T. Tammela, E. Ator, N. Lyubynska, M. G. Achen, D. J. Hicklin, M. Jeltsch, T. V. Petrova, B. Pytowski, S. A. Stacker, S. Yla-Herttuala, D. G. Jackson, K. Alitalo, and D. M. McDonald. 2005. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 115:247-257.
55. Chetta, A., A. Zanini, O. Torre, and D. Olivieri. 2007. Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6:41-45.
56. Vrugt, B., S. Wilson, A. Bron, S. T. Holgate, R. Djukanovic, and R. Aalbers. 2000. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J* 15:1014-1021.
57. Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q. A. Hamid. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107:1034-1038.
58. Zanini, A., A. Chetta, M. Saetta, S. Baraldo, R. D'Ippolito, A. Castagnaro, M. Neri, and D. Olivieri. 2007. Chymase-positive mast cells play a role in the vascular component of airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120:329-333.
59. Knox, A. J., L. Corbett, J. Stocks, E. Holland, Y. M. Zhu, and L. Pang. 2001. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. *Faseb J* 15:2480-2488.

60. Boussat, S., S. Eddahibi, A. Coste, V. Fataccioli, M. Gouge, B. Housset, S. Adnot, and B. Maitre. 2000. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L371-378.
61. Boesiger, J., M. Tsai, M. Maurer, M. Yamaguchi, L. F. Brown, K. P. Claffey, H. F. Dvorak, and S. J. Galli. 1998. Mast cells can secrete vascular permeability factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 188:1135-1145.
62. Nakayama, T., L. Yao, and G. Tosato. 2004. Mast cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumors. *J Clin Invest* 114:1317-1325.
63. Abdel-Majid, R. M., and J. S. Marshall. 2004. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol* 172:1227-1236.
64. Cao, J., N. Papadopoulou, D. Kempuraj, W. S. Boucher, K. Sugimoto, C. L. Cetrulo, and T. C. Theoharides. 2005. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 174:7665-7675.
65. Feoktistov, I., S. Ryzhov, A. E. Goldstein, and I. Biaggioni. 2003. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res* 92:485-492.

66. Kirshenbaum, A. S., C. Akin, Y. Wu, M. Rottem, J. P. Goff, M. A. Beaven, V. K. Rao, and D. D. Metcalfe. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res* 27:677-682.
67. Butterfield, J. H., D. A. Weiler, L. W. Hunt, S. R. Wynn, and P. C. Roche. 1990. Purification of tryptase from a human mast cell line. *J Leukoc Biol* 47:409-419.
68. Schaloske, R. H., and E. A. Dennis. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761:1246-1259.
69. Triggiani, M., F. Granata, A. Frattini, and G. Marone. 2006. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A(2). *Biochim. Biophys. Acta* 1761:1289-1300.
70. Schroder, T., E. Kivilaakso, P. K. Kinnunen, and M. Lempinen. 1980. Serum phospholipase A<sub>2</sub> in human acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 15:633-636.
71. Vadas, P. 1984. Elevated plasma phospholipase A<sub>2</sub> levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. *J. Lab. Clin. Med.* 104:873-881.
72. Bowton, D. L., M. C. Seeds, M. B. Fasano, B. Goldsmith, and D. A. Bass. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage

- fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:421-425.
73. Seilhamer, J. J., W. Pruzanski, P. Vadas, S. Plant, J. A. Miller, J. Kloss, and L. K. Johnson. 1989. Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 264:5335-5338.
74. Laye, J. P., and J. H. Gill. 2003. Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov Today* 8:710-716.
75. Kim, D. K., T. Fukuda, B. T. Thompson, B. Cockrill, C. Hales, and J. V. Bonventre. 1995. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A<sub>2</sub> activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* 269:L109-118.
76. Kugiyama, K., Y. Ota, K. Takazoe, Y. Moriyama, H. Kawano, Y. Miyao, T. Sakamoto, H. Soejima, H. Ogawa, H. Doi, S. Sugiyama, and H. Yasue. 1999. Circulating levels of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100:1280-1284.
77. Nakae, H., S. Endo, K. Inada, H. Yamashita, Y. Yamada, T. Takakuwa, T. Kasai, M. Ogawa, and K. Uchida. 1995. Plasma concentrations of type II phospholipase A<sub>2</sub>, cytokines and eicosanoids in patients with burns. *Burns* 21:422-426.
78. Partrick, D. A., E. E. Moore, C. C. Silliman, C. C. Barnett, and F. A. Kuypers. 2001. Secretory phospholipase A2 activity correlates with postinjury multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 29:989-993.

79. Silliman, C. C., E. E. Moore, G. Zallen, R. Gonzalez, J. L. Johnson, D. J. Elzi, X. Meng, K. Hanasaki, J. Ishizaki, H. Arita, L. Ao, K. M. England, and A. Banerjee. 2002. Presence of the M-type sPLA<sub>2</sub> receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283:C1102-1113.
80. Triggiani, M., F. Granata, A. Oriente, V. De Marino, M. Gentile, C. Calabrese, C. Palumbo, and G. Marone. 2000. Secretory phospholipases A<sub>2</sub> induce  $\beta$ -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J. Immunol.* 164:4908-4915.
81. Perrin-Cocon, L., S. Agaue, F. Coutant, A. Masurel, S. Bezzine, G. Lambeau, P. Andre, and V. Lotteau. 2004. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 34:2293-2302.
82. Ramoner, R., T. Putz, H. Gander, A. Rahm, G. Bartsch, C. Schaber, and M. Thurnher. 2005. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Blood* 105:3583-3587.
83. Gambero, A., E. C. Landucci, M. H. Toyama, S. Marangoni, J. R. Giglio, H. B. Nader, C. P. Dietrich, G. De Nucci, and E. Antunes. 2002. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A<sub>2</sub>: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol* 63:65-72.
84. Sundell, I. B., K. A. Aziz, M. Zuzel, and R. D. Theakston. 2003. The role of phospholipases A<sub>2</sub> in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms. *Toxicon* 41:459-468.



85. Granata, F., A. Petraroli, E. Boilard, S. Bezzine, J. Bollinger, L. Del Vecchio, M. H. Gelb, G. Lambeau, G. Marone, and M. Triggiani. 2005. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A<sub>2</sub> in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J. Immunol.* 174:464-474.
86. Triggiani, M., F. Granata, A. Oriente, M. Gentile, A. Petraroli, B. Balestrieri, and G. Marone. 2002. Secretory phospholipases A<sub>2</sub> induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur. J. Immunol.* 32:67-76.
87. Beck, G., B. A. Yard, J. Schulte, M. Haak, K. van Ackern, F. J. van der Woude, and M. Kaszkin. 2003. Secreted phospholipases A<sub>2</sub> induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:731-737.
88. Jo, E. J., H. Y. Lee, Y. N. Lee, J. I. Kim, H. K. Kang, D. W. Park, S. H. Baek, J. Y. Kwak, and Y. S. Bae. 2004. Group IB secretory phospholipase A<sub>2</sub> stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-kappaB in human neutrophils. *J. Immunol.* 173:6433-6439.
89. Park, D. W., J. R. Kim, S. Y. Kim, J. K. Sonn, O. S. Bang, S. S. Kang, J. H. Kim, and S. H. Baek. 2003. Akt as a mediator of secretory phospholipase A<sub>2</sub> receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* 170:2093-2099.
90. Enomoto, A., M. Murakami, E. Valentin, G. Lambeau, M. H. Gelb, and I. Kudo. 2000. Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A<sub>2</sub> in the

- regulation of degranulation and prostaglandin D<sub>2</sub> synthesis in mast cells. *J Immunol* 165:4007-4014.
91. Jamal, O. S., P. G. Conaghan, A. M. Cunningham, P. M. Brooks, V. F. Munro, and K. F. Scott. 1998. Increased expression of human type IIa secretory phospholipase A<sub>2</sub> antigen in arthritic synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 57:550-558.
  92. Lilja, I., C. Gustafson-Svard, L. Franzen, R. Sjodahl, S. Andersen, and B. Johansen. 2000. Presence of group IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> in mast cells and macrophages in normal human ileal submucosa and in Crohn's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38:1231-1236.
  93. Servillo, L., C. Balestrieri, A. Giovane, P. Pari, D. Palma, G. Giannattasio, M. Triggiani, and M. L. Balestrieri. 2006. Lysophospholipid transacetylase in the regulation of PAF levels in human monocytes and macrophages. *Faseb J* 20:1015-1017.
  94. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
  95. Granata, F., A. Frattini, S. Loffredo, A. Del Prete, S. Sozzani, G. Marone, and M. Triggiani. 2006. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A<sub>2</sub> in human lung macrophages. *Eur J Immunol* 36:1938-1950.
  96. Ribatti, D., G. Polimeno, A. Vacca, A. Marzullo, E. Crivellato, B. Nico, G. Lucarelli, and F. Dammacco. 2002. Correlation of bone marrow angiogenesis

- and mast cells with tryptase activity in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 16:1680-1684.
97. Fonteh, A. N., D. A. Bass, L. A. Marshall, M. Seeds, J. M. Samet, and F. H. Chilton. 1994. Evidence that secretory phospholipase A<sub>2</sub> plays a role in arachidonic acid release and eicosanoid biosynthesis by mast cells. *J. Immunol.* 152:5438-5446.
  98. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
  99. Snedecor, G. W. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames.
  100. Ruohola, J. K., E. M. Valve, M. J. Karkkainen, V. Joukov, K. Alitalo, and P. L. Harkonen. 1999. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 149:29-40.
  101. Joukov, V., T. Sorsa, V. Kumar, M. Jeltsch, L. Claesson-Welsh, Y. Cao, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo. 1997. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J* 16:3898-3911.
  102. Stacker, S. A., K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R. J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo, and M. G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 274:32127-32136.

103. Gupta, R. A., and R. N. Dubois. 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1:11-21.
104. Rask, K., Y. Zhu, W. Wang, L. Hedin, and K. Sundfeldt. 2006. Ovarian epithelial cancer: a role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Mol Cancer* 5:62.
105. Tsujii, M., S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. DuBois. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93:705-716.
106. Hasko, G., and B. N. Cronstein. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25:33-39.
107. Marone, G., M. Plaut, and L. M. Lichtenstein. 1978. Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes. *J Immunol* 121:2153-2159.
108. Harris, A. L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
109. Decking, U. K., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader. 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 81:154-164.
110. Caruso, M., S. T. Holgate, and R. Polosa. 2006. Adenosine signalling in airways. *Curr Opin Pharmacol* 6:251-256.
111. Mantovani, A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, and A. Sica. 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25:315-322.

112. Bingle, L., N. J. Brown, and C. E. Lewis. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196:254-265.
113. Fawcett, D. W. 1955. An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. *Anat Rec* 121:29-51.
114. Bowers, H. M., Jr., R. C. Mahapatro, and J. W. Kennedy. 1979. Numbers of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 43:568-573.
115. Paiva, D. D., J. C. Morais, J. Pilotto, V. Veloso, F. Duarte, and H. L. Lenzi. 1996. Spectrum of morphologic changes of lymph nodes in HIV infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:371-379.

**Tabella I. Classificazione delle Fosfolipasi A<sub>2</sub>**

Gruppo	Sottogruppo	Specie	Origine	Classe
I	A	Serpenti	—	Secretoria
	B	Mammiferi	Polmone/rene/pancreas/milza	Secretoria
II	A	Mammiferi/Serpenti	Polmone/placenta/siero/milza/timo/midollo osseo/sinovia/ condrociti/cheratinociti/piastrine/mastociti/macrofagi	Secretoria
	B	Serpenti	—	Secretoria
	C	Roditori	—	Secretoria
	D	Uomo/Roditori	Organi linfoide/colon/pancreas/endotelio/ eosinofili/cheratinociti/mastociti	Secretoria
	E	Uomo/Roditori	Cervello/cuore/polmone/placenta/muscolo liscio	Secretoria
	F	Uomo/Roditori	Rene/fegato/placenta/sinovia/testicolo/timo/endotelio	Secretoria
III		Uomo/Roditori	Cuore/rene/fegato/muscolo scheletrico	Secretoria
IV	A/B/C	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica
V		Uomo/Roditori	Polmone/cuore/placenta/epitelio respiratorio/condrociti/ fibroblasti/cheratinociti/macrofagi/neutrofili	Secretoria
VI	A-1/A-2/B	Mammiferi	La maggior parte delle cellule di mammifero	Citosolica
VII (Acetilidrolasi)		Mammiferi	Plasma/fegato/rene/macrofagi	Secretoria
VIII	A/B	Uomo	Cervello	Citosolica
IX		Lumaca marina	—	Secretoria
X		Uomo/Topo	Intestino/polmone/milza/timo/epitelio e endotelio respiratorio/macrofagi/cheratinociti/neutrofili	Secretoria
XI	A/B	Piante	—	Secretoria
XII	A	Uomo/Topo	Cuore/cervello/intestino/rene/fegato/polmone/ pancreas/placenta/muscolo scheletrico	Secretoria
	B	Uomo	Intestino/rene/fegato	Secretoria

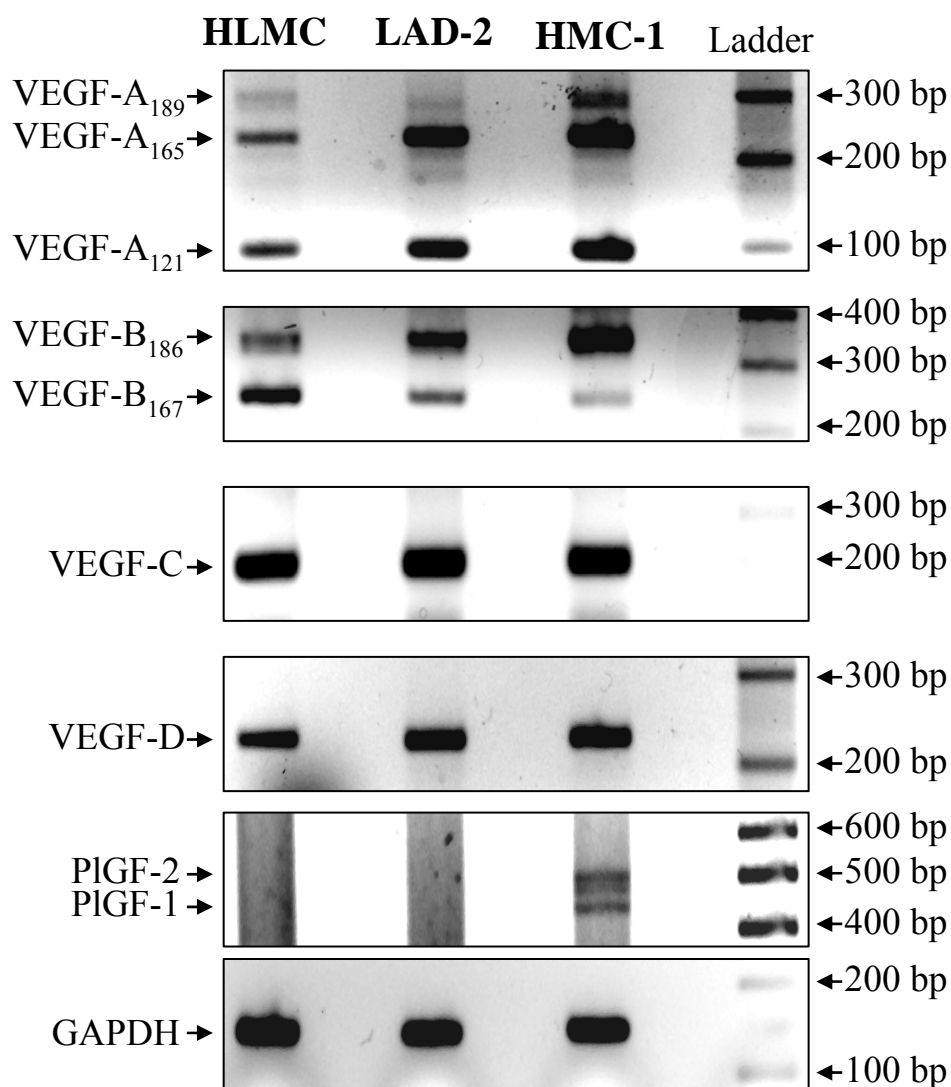
**Tabella II. Sequenza dei Primers e Condizioni per RT-PCR ed RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)**

Target	Lunghezza del prodotto (bp)	Temperatura di annealing (°C)	Primer (5'-3')	Genbank Accession N° o Referenza
<b>PIGF</b> (RT-PCR)	440 (Is1)	51°C	Forward GAGGCTGTTCCTTGCTTC	NM_002632
	516 (Is2)		Reverse GGTTACCTCCGGGGAACAG	
	225 (Is <sub>121</sub> )		Forward TCTTCAAGCCATCCTGTGTG	
<b>VEGF-A</b> (RT-PCR)	297 (Is <sub>145</sub> )	51°C	Reverse GCCTCGGCTTGTCACATC	NM_003376
	357 (Is <sub>165</sub> )			
	429 (Is <sub>189-206</sub> )			
<b>VEGF-A<sub>165</sub></b> (qRT-PCR)	79	54.4°C	Forward GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC	NM_003376
			Reverse TGATTCTGCCCTCCTCCTTCTG	
<b>VEGF-B</b> (RT-PCR)	230 (Is <sub>167</sub> )	59°C	Forward TGTCCCTGGAAGAACACAGCC	NM_003377
	336 (Is <sub>186</sub> )		Reverse GCCATGTGTCACCTTCGCA	
<b>VEGF-B</b> (qRT-PCR)	128	52°C	Forward AGGACAGAGTTGGAAGAGGAG	NM_003377
			Reverse AGGAAGAGCCAGTTGTAAGATG	
<b>VEGF-C</b> (qRT-PCR)	197	52°C	Forward ATGTTTTCTTCGGATGCTGGA	NM_005429
			Reverse CATTGGCTGGGGAAGAGTTT	
<b>VEGF-D</b> (qRT-PCR)	226	52°C	Forward GTATGGACTCTCGCTCAGCAT	NM_004469
			Reverse AGGCTCTCTTCATTGCAACAG	
<b>GAPDH</b> (qRT-PCR)	141	55°C	Forward GTCCACTGGCGTCTTCAC	Granata 2006
			Reverse CTTGAGGCTGTTGTCATACTTC	

**Tabella III. Sequenza dei Primers e Condizioni per RT-PCR**

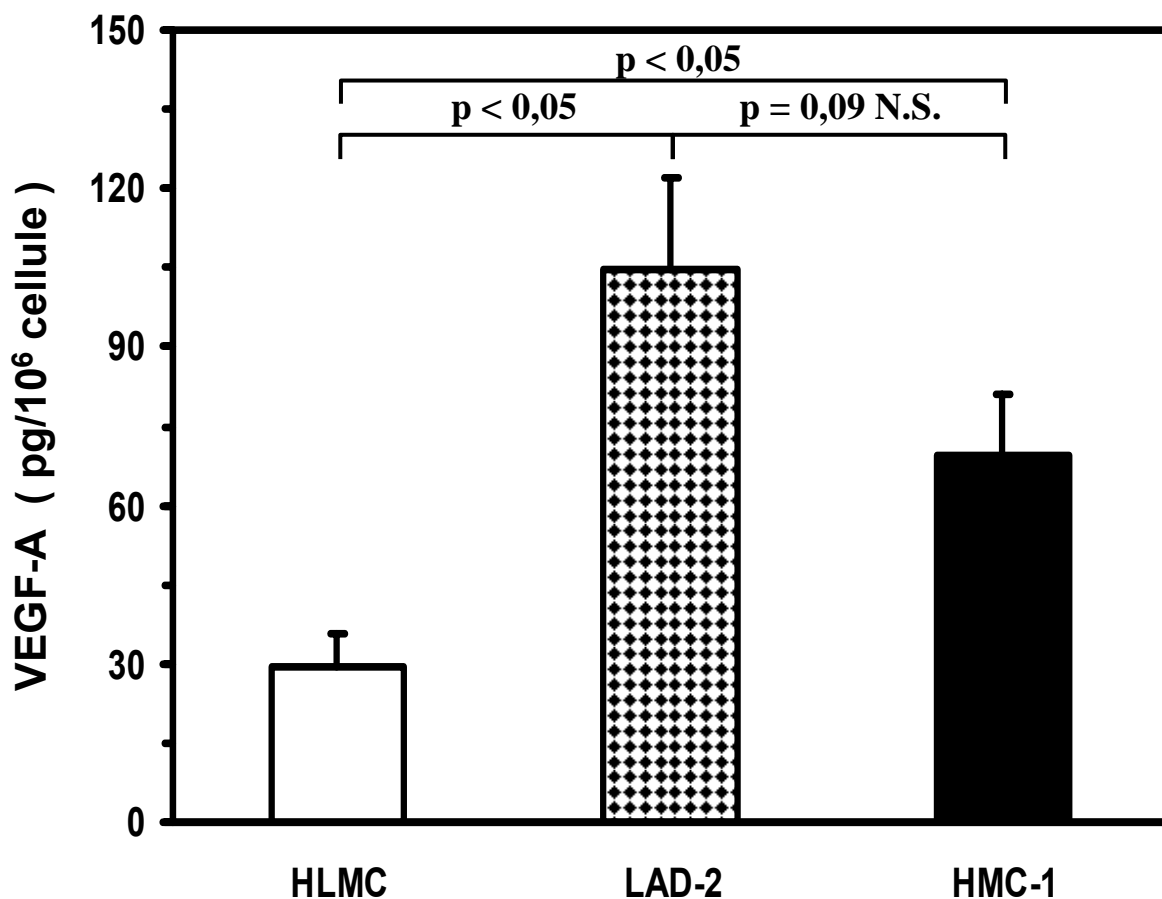
Target	Lunghezza del prodotto (bp)	Temperatura di annealing (°C)	Primer (5'-3')	Genbank Accession N° or Reference
<b>hGIB</b>	341	60°C	Forward TCCTTGTGCTAGCTGTGCTG	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse TGAAGGCCTCACACTCTTTG	
<b>hGIIA</b>	434	57°C	Forward ATGAAGACCCTCCTACTGTT	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse TCAGCAACGAGGGGTGCTCC	
<b>hGIID</b>	294	60°C	Forward GAAAATGCCCATCCTCTCCT	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse AAACGCAGTCGCTTCTGGTA	
<b>hGIIIE</b>	120	53°C	Forward GGTGTTTCCTTTGCCTCCTG	NM_014589
			Reverse CCGCAGTAACAGCCATAGTC	
<b>hGIIF</b>	211	55°C	Forward GACCCACACCCTCTCTCC	NM_0221819
			Reverse GATGCTCTCCCTGCTTACG	
<b>hGIII</b>	500	60°C	Forward TGCCTACAGAATCAGCACGA	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse TTGAGCAGCTGGAACCTCGAT	
<b>hGV</b>	358	60°C	Forward TTGGTTCCTGGCTTGTAGTGTG	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse TGGGTTGTAGCTCCGTAGGTTT	
<b>hGX</b>	370	60°C	Forward GATCCTGGAACCTGGCAGGAA	J Biol Chem 2002; 277:5061
			Reverse TCAGTCACACTTGGGCGAGT	
<b>hGXIIA</b>	105	55°C	Forward TGTTGTCAGGTGCCAGGAG	BC_017218
			Reverse AAGGCGGCGTTCAGGTAC	
<b>hGXIIB</b>	115	55°C	Forward GCCTGTGATTCCCTGGTTGAC	NM_032562
			Reverse ACTCTTCCTTCTCCTCCTCTGC	
<b>GAPDH</b>	141	55°C	Forward GTCCACTGGCGTCTTCAC	J. Immunol. 2005; 174:464
			Reverse CTTGAGGCTGTTGTCATACTTC	





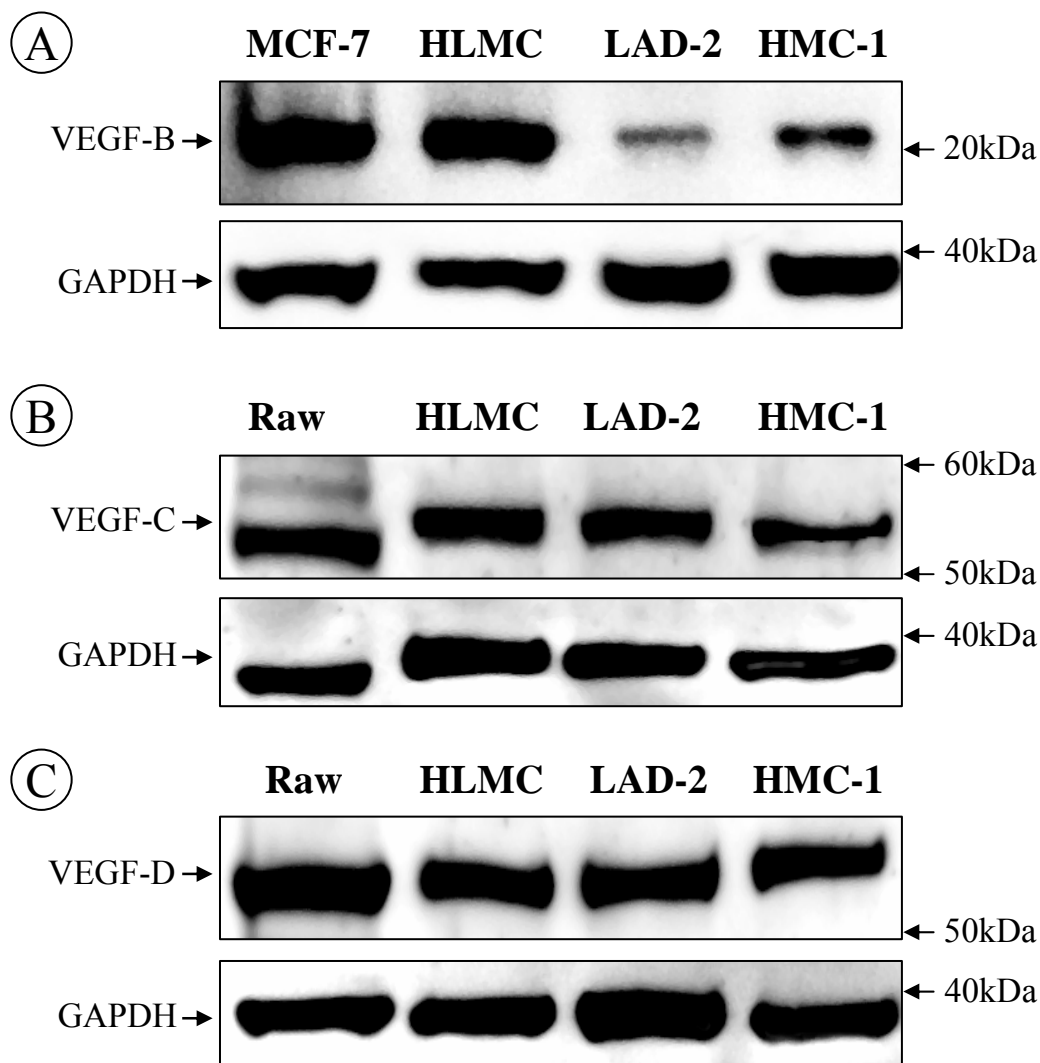
**Figura 1: Espressione delle differenti forme di VEGF nei mastociti umani.**

Le cellule HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state lisate e l'RNA totale è stato estratto. 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto ed amplificato con 40 cicli di PCR utilizzando primers specifici per VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e GAPDH come gene *housekeeping* (vedi Tabella II). I prodotti dell'amplificazione specifica RT-PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5 %, marcati con etidio bromuro, visualizzati sotto illuminazione UV e digitalizzati attraverso un sistema di analisi. Questo esperimento è rappresentativo di 6 esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.



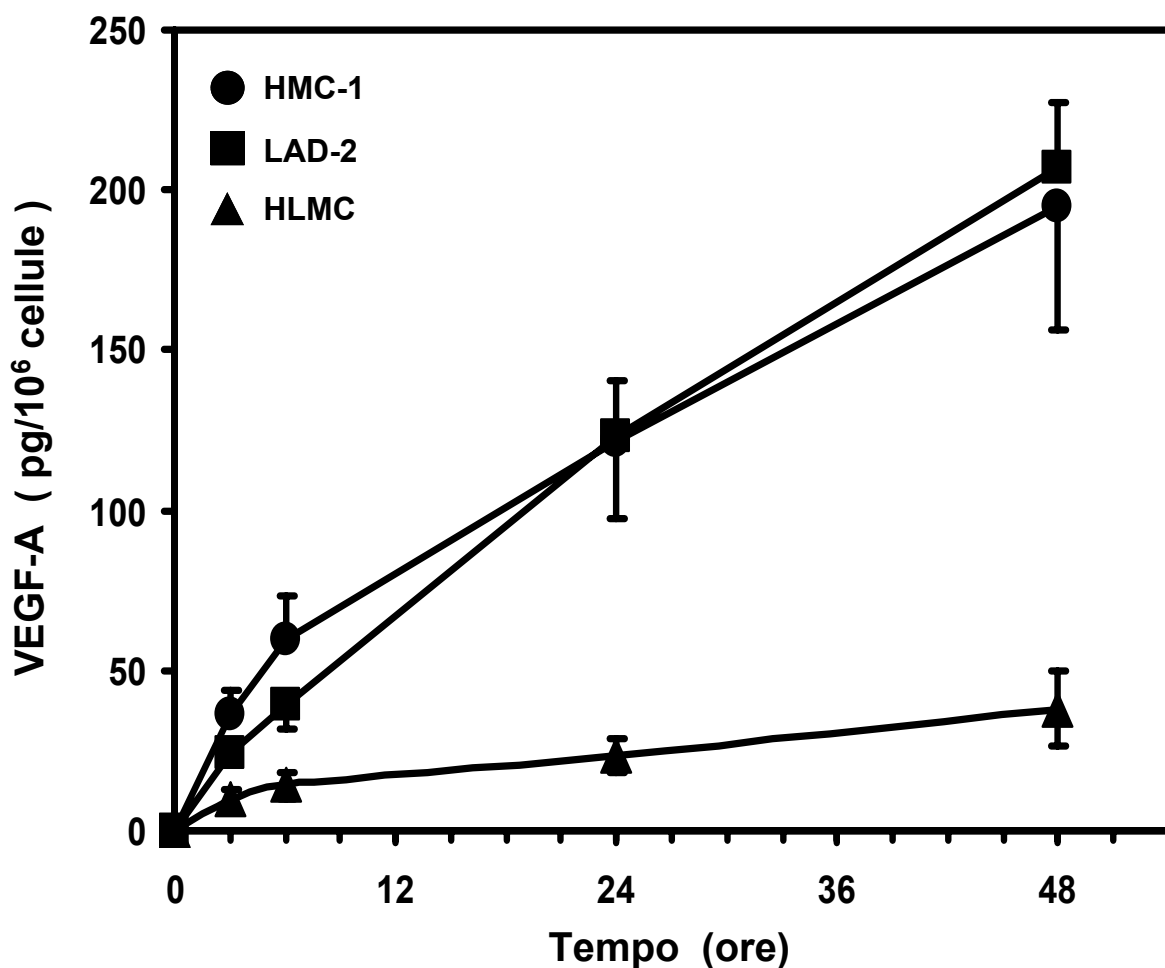
**Figura 2: Analisi del contenuto di VEGF-A nei mastociti umani.**

Le cellule HLMC, LAD-2 ed HMC-1 sono state lisate con cicli di congelamento e scongelamento ed il contenuto totale di VEGF-A è stato misurato mediante ELISA. La concentrazione di VEGF-A negli HLMC, LAD-2 e HMC-1 era di  $28,0 \pm 6,0$  pg/10<sup>6</sup> cellule,  $105,0 \pm 17,0$  pg/10<sup>6</sup> cellule e  $70,0 \pm 11,0$  pg/10<sup>6</sup> cellule, rispettivamente.



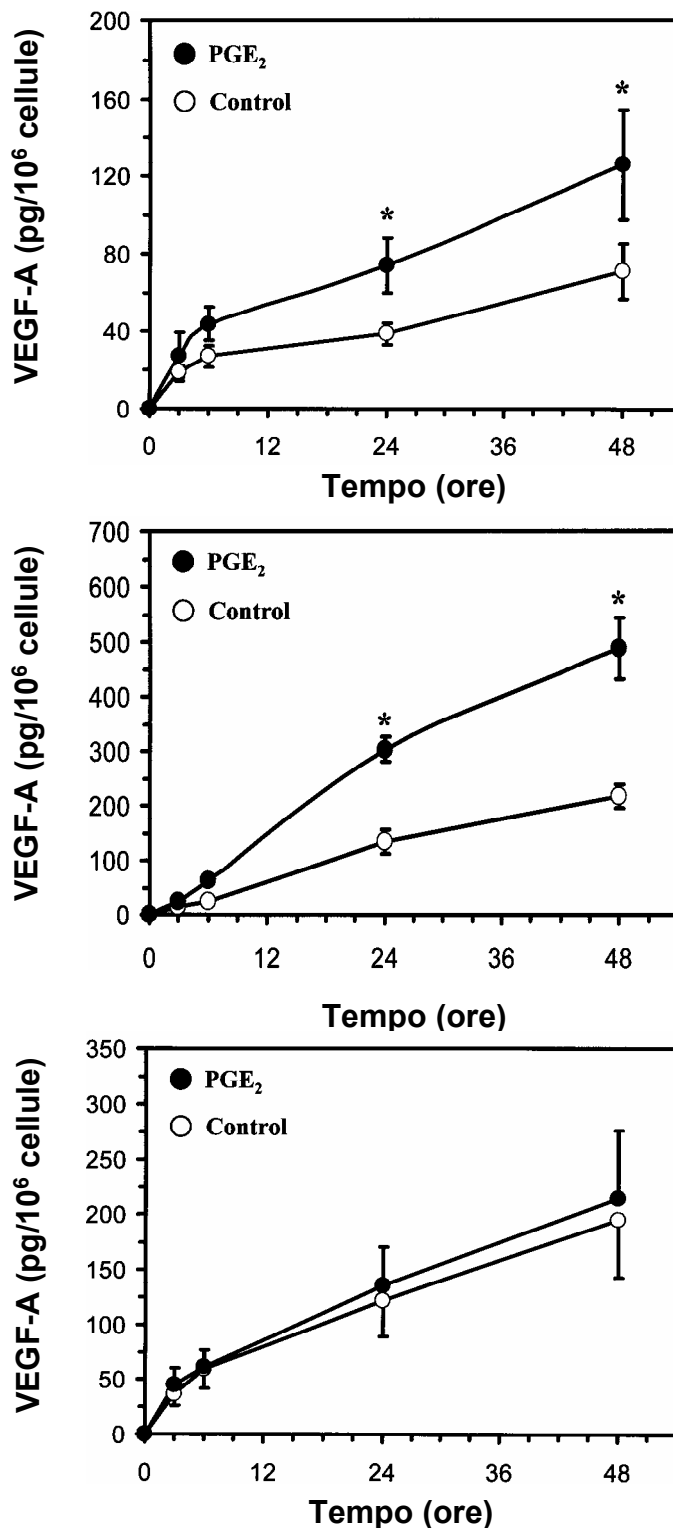
**Figura 3: Espressione delle proteine VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D nei mastociti umani.**

Estratti proteici equivalenti (40  $\mu$ g per campione) di HLHC, LAD-2 ed HMC-1 sono stati sottoposti ad immunoblotting con anticorpi anti-VEGF-B (panello A), anti-VEGF-C (panello B) ed anti-VEGF-D (panello C). Le cellule MCF-7 (esprimenti VEGF-B) e le cellule Raw 264.7 (esprimenti VEGF-C e VEGF-D) sono state utilizzate come controllo positivo. Le membrane sono state sottoposte a blotting con un anticorpo anti-GAPDH per confermare l'equivalenza del contenuto proteico per ogni campione. Questo esperimento è rappresentativo di tre esperimenti nei quali sono stati ottenuti risultati sovrapponibili.



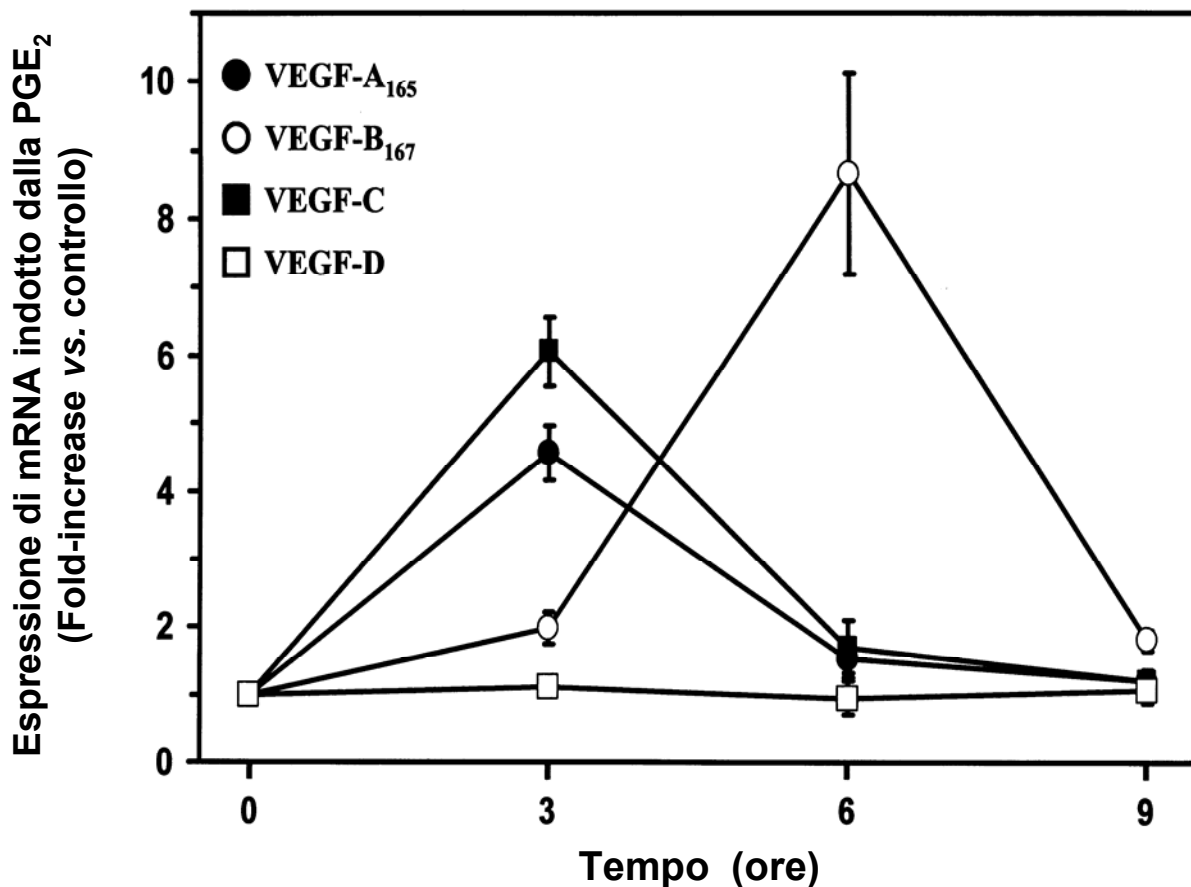
**Figura 4: Cinetica della secrezione spontanea di VEGF-A dai mastociti umani.**

HLMC purificate (▲), cellule LAD-2 (■) ed HMC-1 (●) ( $10^6$  cellule per campione) sono state incubate con IMDM. Ad ogni tempo indicato il sopranatante è stato prelevato e centrifugato (800 g, 4°C, 5 min.). La secrezione di VEGF-A è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come pg VEGF-A/ $10^6$  cellule



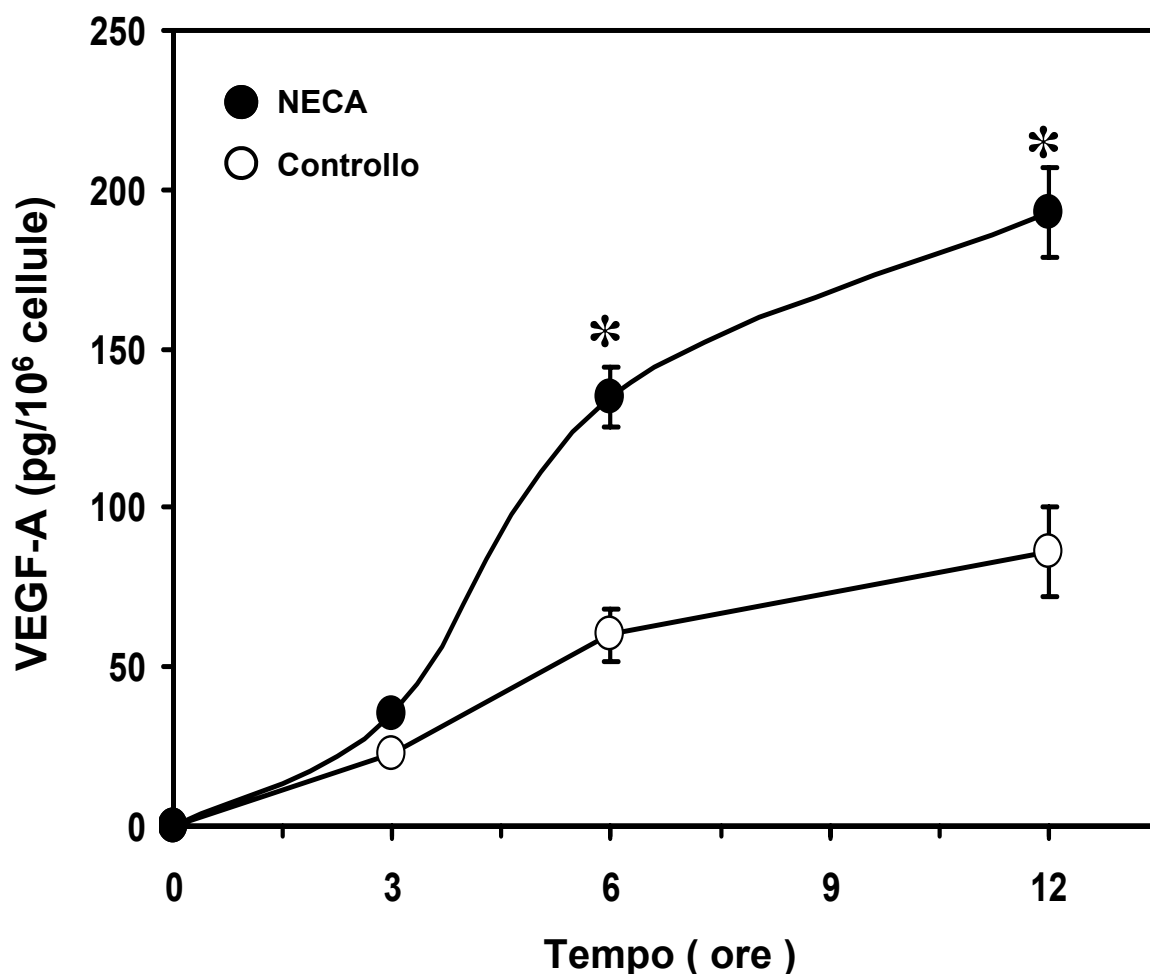
**Figura 5: Cinetica di secrezione di VEGF-A indotta dalla PGE<sub>2</sub> dai mastociti umani**

Gli HLMC (A), le LAD-2 (B) od HMC-1 (C) (10<sup>6</sup> cellule per campione) sono state incubate con IMDM da solo (controllo) o contenente la PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M). Ad ogni tempo indicato i sopranatanti sono stati centrifugati (800 x g, 4°C, 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come pg di VEGF-A/10<sup>6</sup> cellule e come media ± ES di tre esperimenti.



**Figura 6: Cinetiche dell'espressione di mRNA per VEGF in mastociti umani stimolati con PGE<sub>2</sub>.**

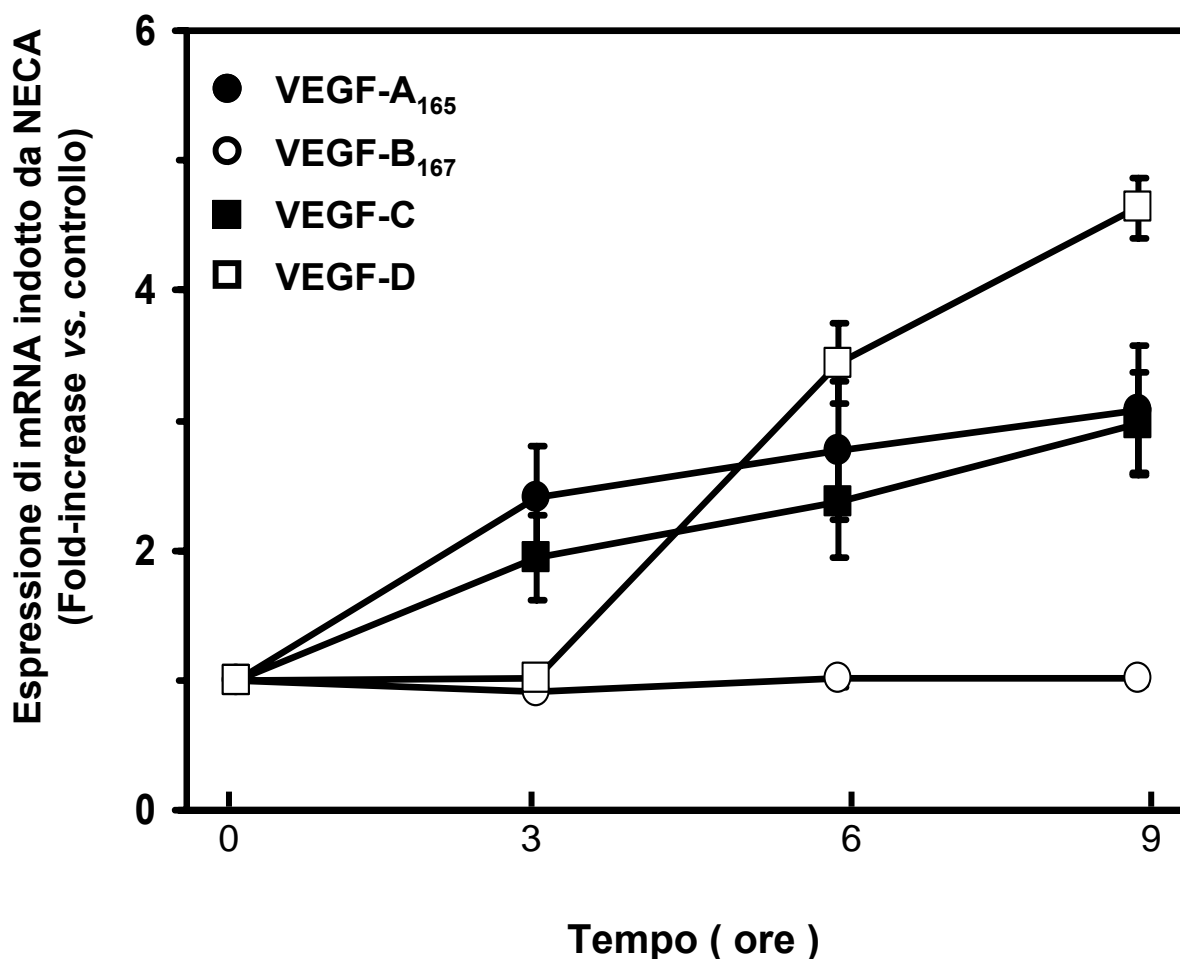
Il grafico riassume l'analisi in real-time RT-PCR per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D in cellule LAD-2 incubate con PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) per i tempi indicati. L'espressione dell'mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D indotta da PGE<sub>2</sub> è indicata come rapporto dell'intensità di segnale delle bande rispetto alle cellule non stimolate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH ed espressi come media ± ES di tre esperimenti.



**Figura 7: Cinetica della secrezione di VEGF-A indotta da NECA dai mastociti umani.**

Le HMC-1 ( $10^6$  cellule per campione) sono state incubate in buffer da solo (controllo) o contenenti NECA ( $10^{-5}$  M). Ad ogni tempo indicato i sopranatanti sono stati centrifugati ( $800 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min). Il dosaggio del VEGF-A è stato eseguito mediante ELISA. I valori sono espressi come pg di VEGF-A/ $10^6$  cellule e espressi come media  $\pm$  ES di tre esperimenti.

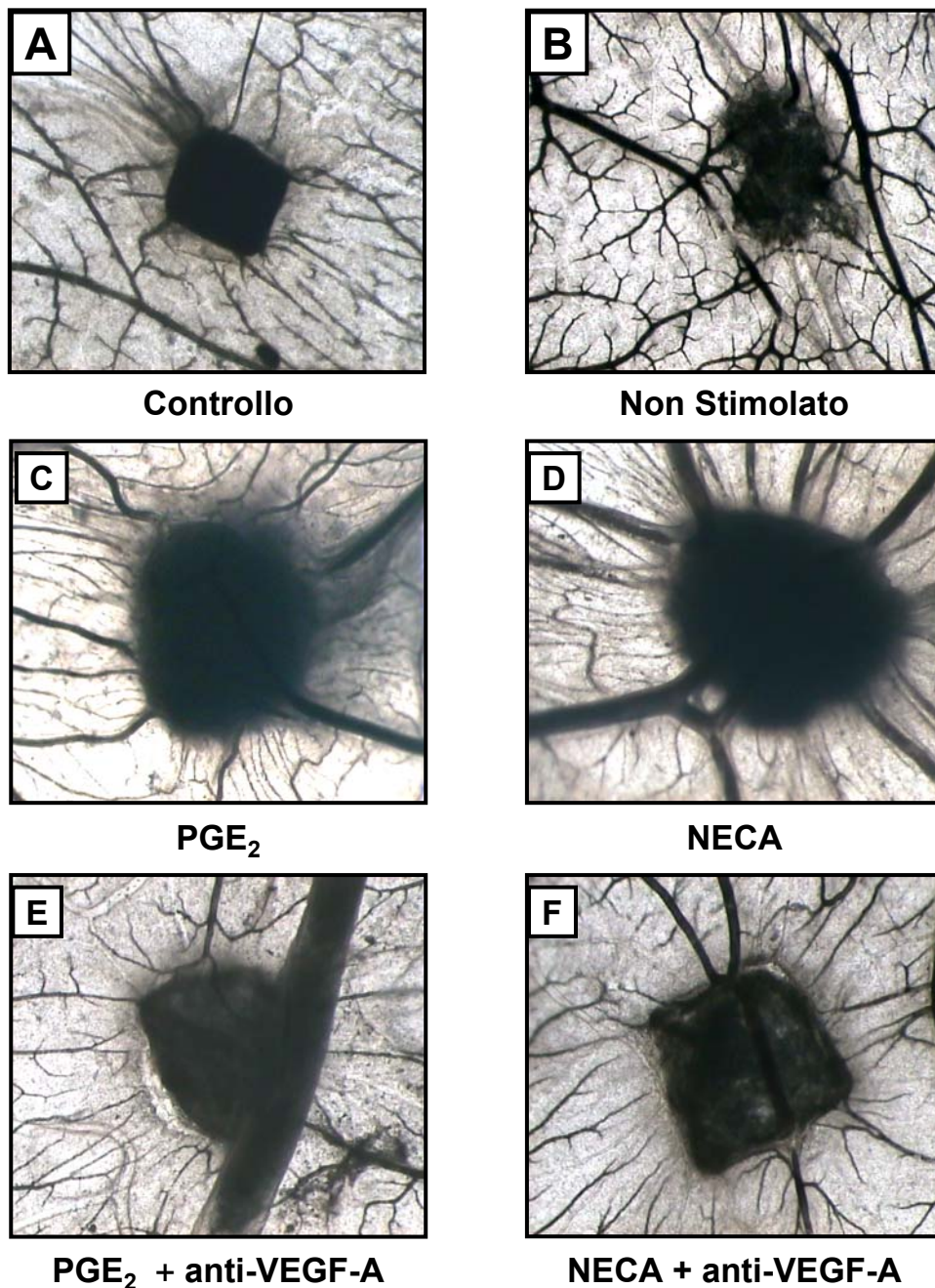
\*  $p < 0,05$  vs. controllo



**Figura 8: Cinetica dell'espressione dell'mRNA per VEGF in mastociti umani stimolati con NECA.**

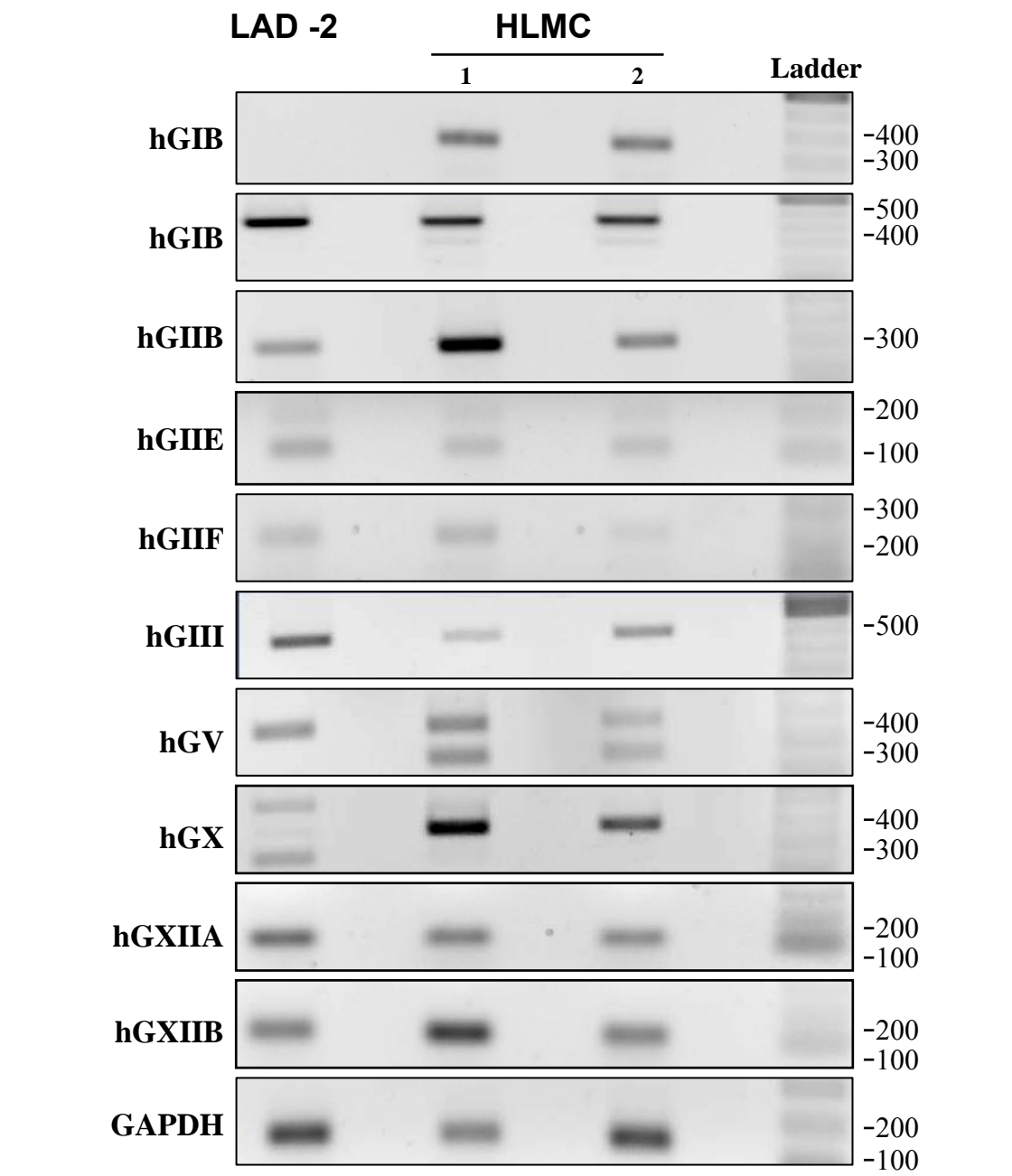
Analisi in real-time RT-PCR per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D di HMC-1 stimolati con NECA (10<sup>-5</sup> M). L'espressione dell'mRNA per VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub>, VEGF-C e VEGF-D indotta da NECA, è indicata come rapporto dell'intensità di segnale delle bande rispetto alle cellule non stimulate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH ed espressi come media ± ES di tre esperimenti.





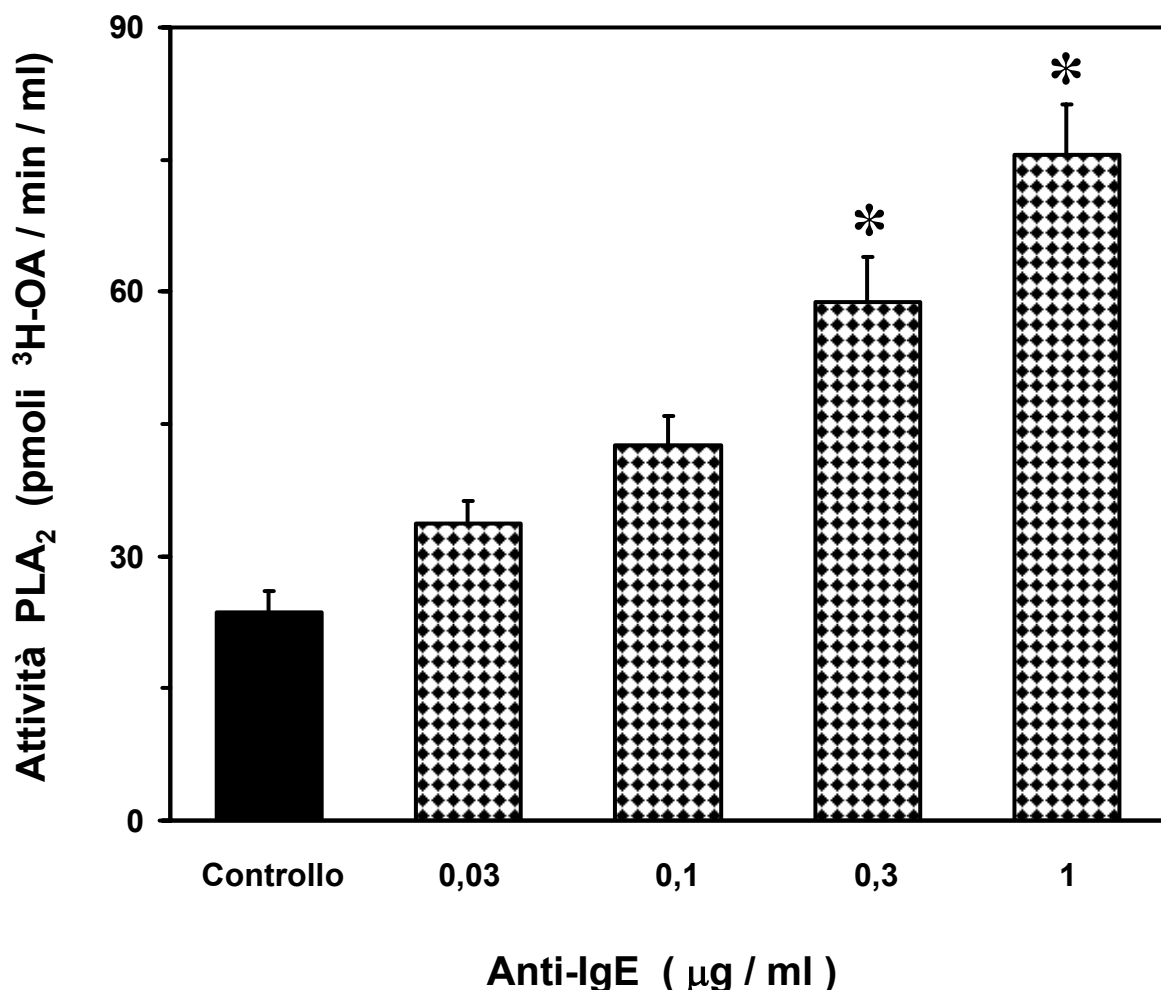
**Figura 9: Attività angiogenica dei sopranatanti degli HLMC nelle CAM di embrione di pollo.**

Le CAM sono state impiantate con spugna di gelatina assorbita con buffer (A, controllo), con sopranatanti degli HLMC incubati (24 ore, 37°C) con o senza (B, non stimolato) PGE<sub>2</sub> (C, 10<sup>-6</sup> M), o NECA (D, 10<sup>-5</sup>M). In E and F, i sopranatanti degli HLMC stimolati con PGE<sub>2</sub> o NECA rispettivamente, sono stati trattati con un anticorpo anti-VEGF-A prima dell'assorbimento sulle spugne. Le CAM sono state esaminate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio ed i vasi sanguigni infiltranti le spugne sono stati contati ad un ingrandimento 50x.



**Figura 10: Espressione di varie isoforme di sPLA<sub>2</sub> nei mastociti umani.**

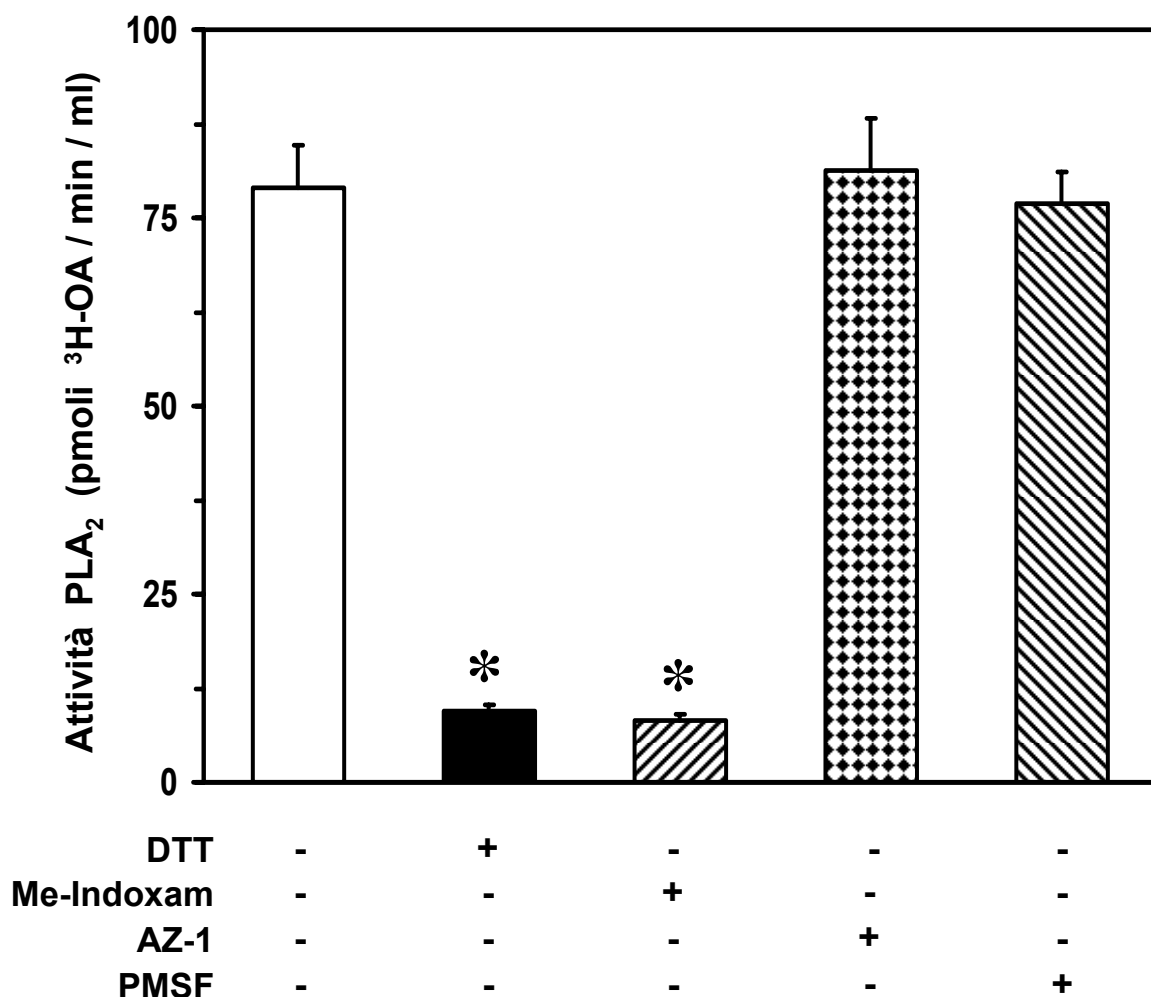
Le cellule LAD-2 e gli HLMC sono stati lisati e l'RNA totale è stato estratto. 1µg di RNA totale è stato retrotrascritto ed amplificato con 35 cicli di PCR utilizzando primers specifici per le diverse isoforme di sPLA<sub>2</sub> e per GAPDH (vedi Tabella III). I prodotti dell'amplificazione specifica RT-PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5 %, marcati con etidio bromuro, visualizzati sotto illuminazione UV e digitalizzati attraverso un sistema di analisi.



**Figura 11: Effetto di concentrazioni crescenti di anti-IgE sulla secrezione dell'attività PLA<sub>2</sub> da parte dei mastociti polmonari.**

Le cellule sono state incubate (30 min, 37°C) con le concentrazioni indicate di anti-IgE. Al termine della incubazione, il sopranatante è stato raccolto, centrifugato (1.200 rpm, 8 min, 4°C) ed incubato (60 min, 37°C) con membrane di *Escherichia coli* marcate con [<sup>3</sup>H]-Acido oleico. La frazione lipidica è stata estratta ed i prodotti radioattivi sono stati isolati mediante cromatografia su strato sottile e quantificati. L'attività PLA<sub>2</sub> è espressa come pmoli di [<sup>3</sup>H]-AO idrolizzato/min/ml. I risultati rappresentano la media ± ES di tre esperimenti.

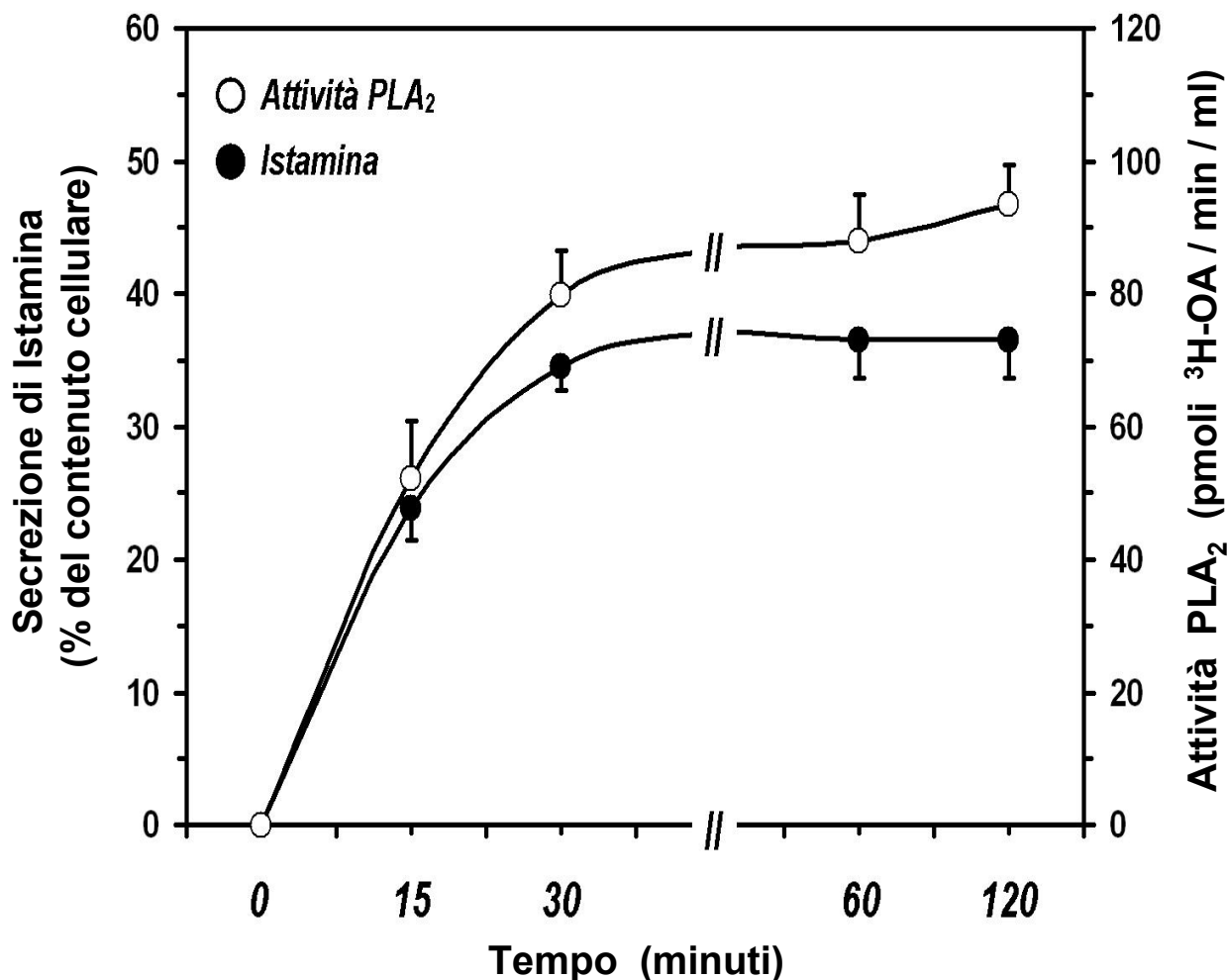
\*  $p < 0,05$  vs. controllo



**Figura 12: Caratterizzazione farmacologica dell'attività PLA<sub>2</sub> secreta dai mastociti polmonari stimolati con anti-IgE.**

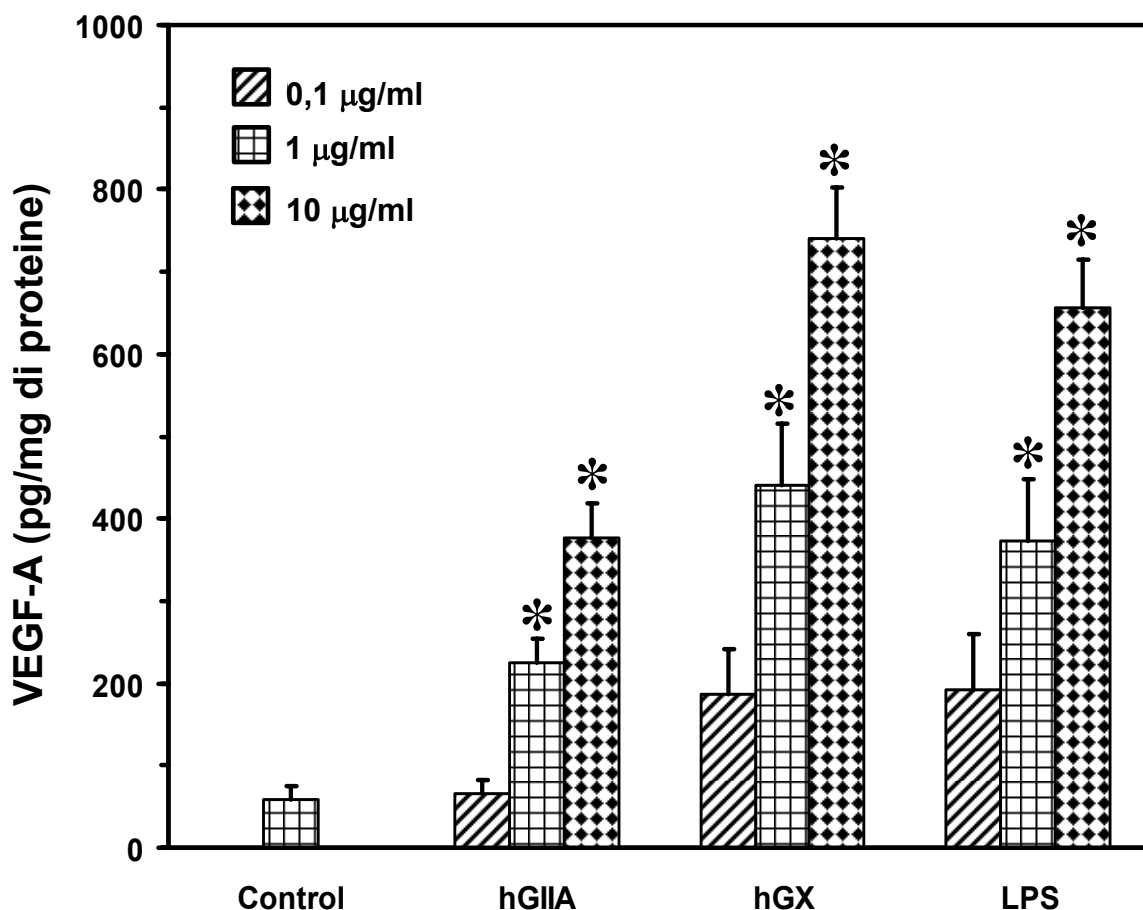
Gli HLMC sono stati incubati con anti-IgE. Al termine dell'incubazione, il sopranatante è stato raccolto e centrifugato (1.200 rpm, 4°C). Aliquote del sopranatante sono state preincubate (30 min, 37°C) con 10 mM DTT, 10 µM Me-Indoxam, AZ-1 10 µM o 2 mM PMSF e dopo incubate con membrane di *Escherichia coli* marcate con [<sup>3</sup>H]-Acido oleico. L'attività PLA<sub>2</sub> nel sopranatante dei mastociti, non trattato o trattato con gli inibitori, è espressa come pmoli di [<sup>3</sup>H]-AO idrolizzato/min/ml. I risultati rappresentano la media ± ES di quattro esperimenti.

\*  $p < 0,05$  vs. sopranatante non trattato.



**Figura 13: Cinetiche della secrezione dell'attività PLA<sub>2</sub> e dell'istamina da parte dei mastociti polmonari stimolati con anti-IgE.**

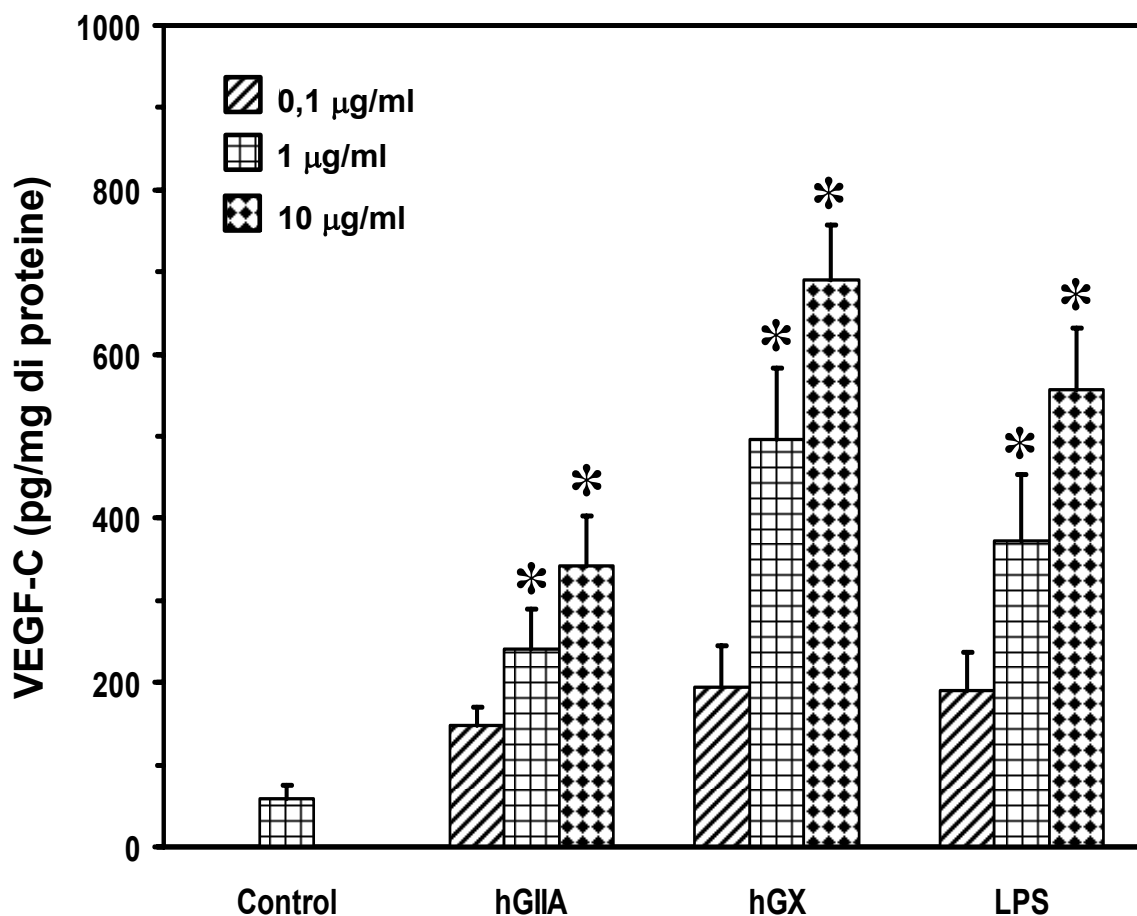
Le cellule sono state incubate (15-120 min, 37°C) con anti-IgE (1 µg/ml). A ciascuno dei tempi indicati il sopranatante è stato raccolto e centrifugato (1.200 rpm, 4°C). L'attività PLA<sub>2</sub> nel sopranatante è stata determinata mediante dosaggio enzimatico ed è espressa come pmoli di [<sup>3</sup>H]-AO idrolizzato/min/ml. L'istamina è stata dosata con metodica immunoenzimatica ed è espressa come percentuale del contenuto cellulare totale determinato in aliquote cellulari lisate con cicli di congelamento e scongelamento. I risultati rappresentano la media ± ES di tre esperimenti.



**Figura 14: Effetto di concentrazioni crescenti di sPLA<sub>2</sub> di gruppo IIA e X sulla secrezione di VEGF-A dai macrofagi polmonari umani.**

Le cellule sono state incubate (37°C, 24 ore) con le concentrazioni riportate delle due sPLA<sub>2</sub>. Alla termine dell'incubazione, il sopranatante è stato prelevato e centrifugato (1.000 g, 4°C). La secrezione di VEGF-A è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come pg di VEGF-A/mg di proteine.

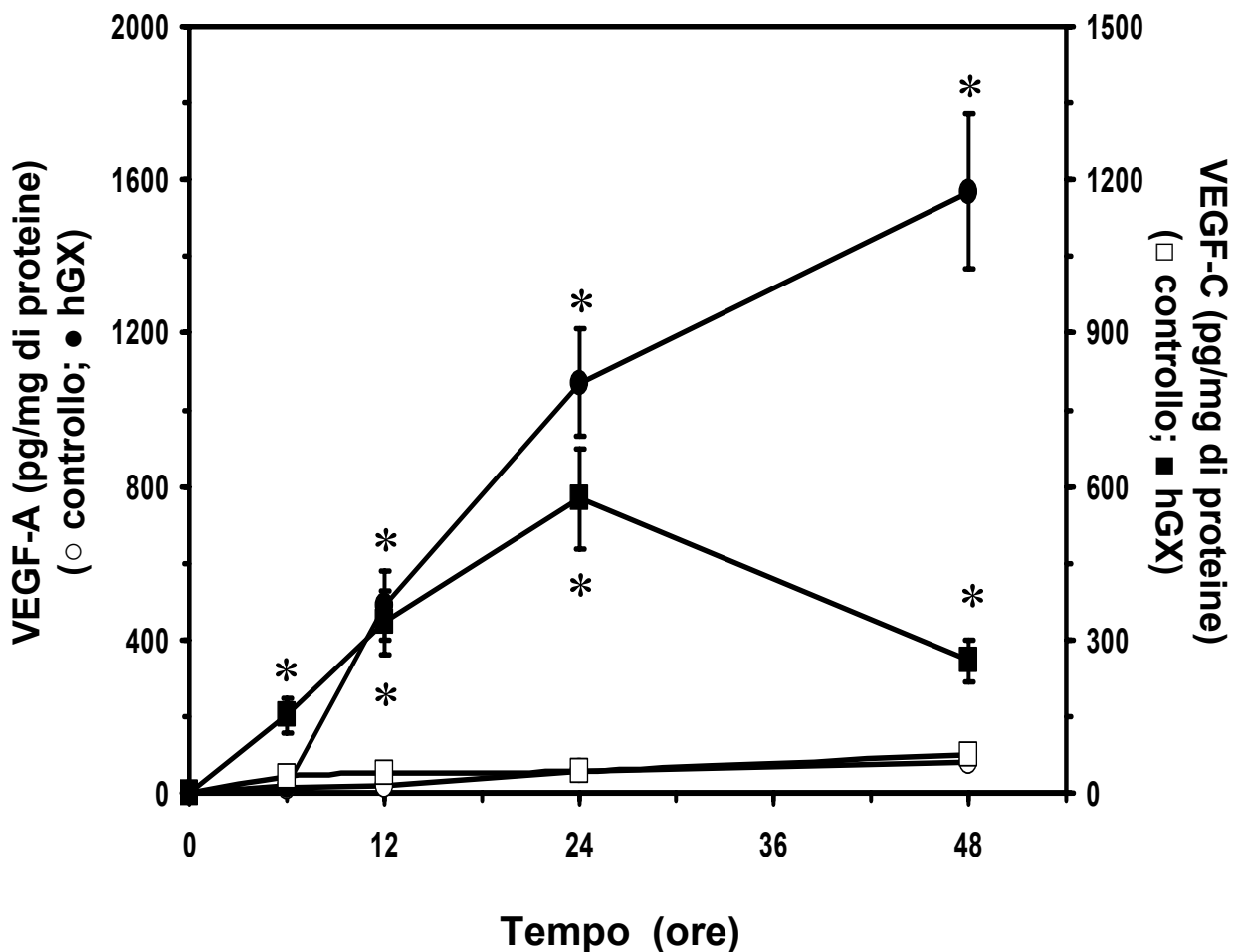
\* p < 0,05 vs. controllo



**Figura 15: Effetto di concentrazioni crescenti di sPLA<sub>2</sub> di gruppo IIA e X sulla secrezione di VEGF-C dai macrofagi polmonari umani.**

Le cellule sono state incubate (37°C, 24 ore) con le concentrazioni riportate delle due sPLA<sub>2</sub>. Alla termine dell'incubazione, il sopranatante è stato prelevato e centrifugato (1.000 g, 4°C). La secrezione di VEGF-C è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come pg di VEGF-C/mg di proteine.

\* p < 0,05 vs. controllo

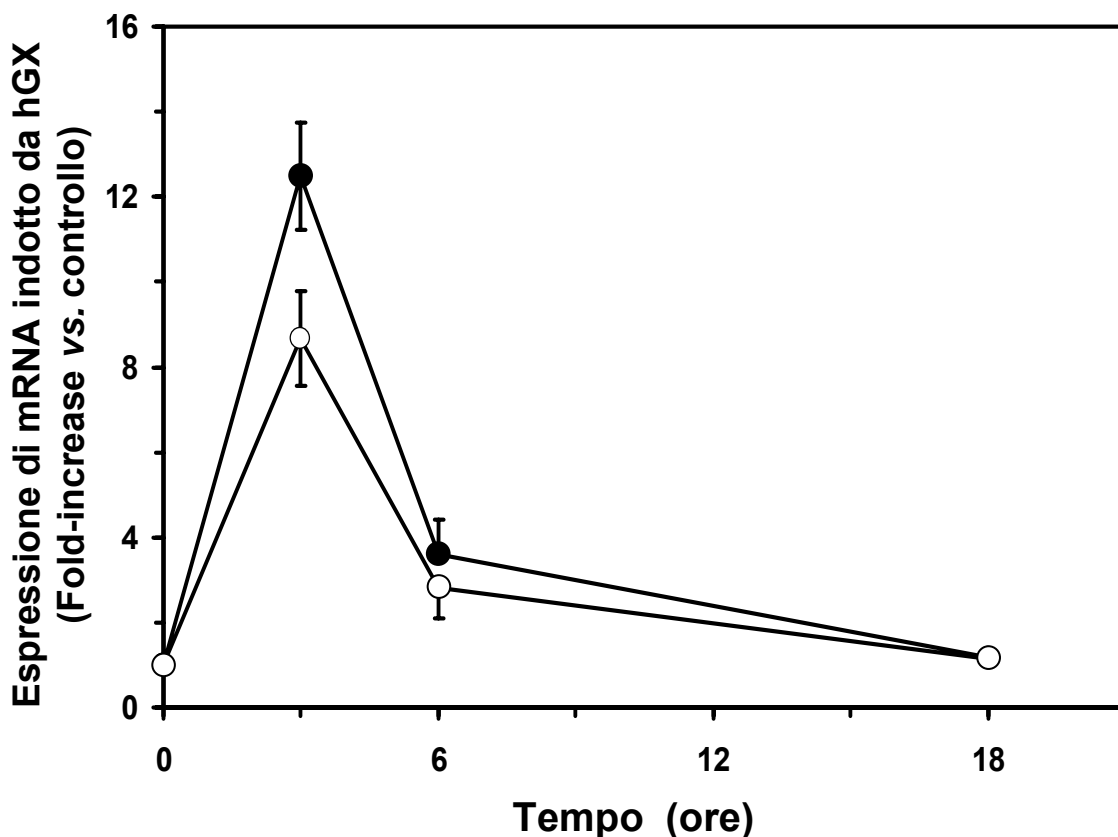


**Figura 16: Cinetica della secrezione di VEGF-A e VEGF-C indotta da hGX nei macrofagi polmonari umani.**

I macrofagi ( $10^6$  cellule per campione) sono stati incubati in buffer da solo (controllo) o contenenti hGX (3  $\mu\text{g/ml}$ ). Ad ogni tempo indicato i sopranatanti sono stati centrifugati (800 x g, 4°C, 5 min). I dosaggi del VEGF-A e VEGF-C sono stati eseguiti mediante ELISA. I valori sono espressi come pg di VEGF/mg di proteine e espressi come media  $\pm$  ES di tre esperimenti.

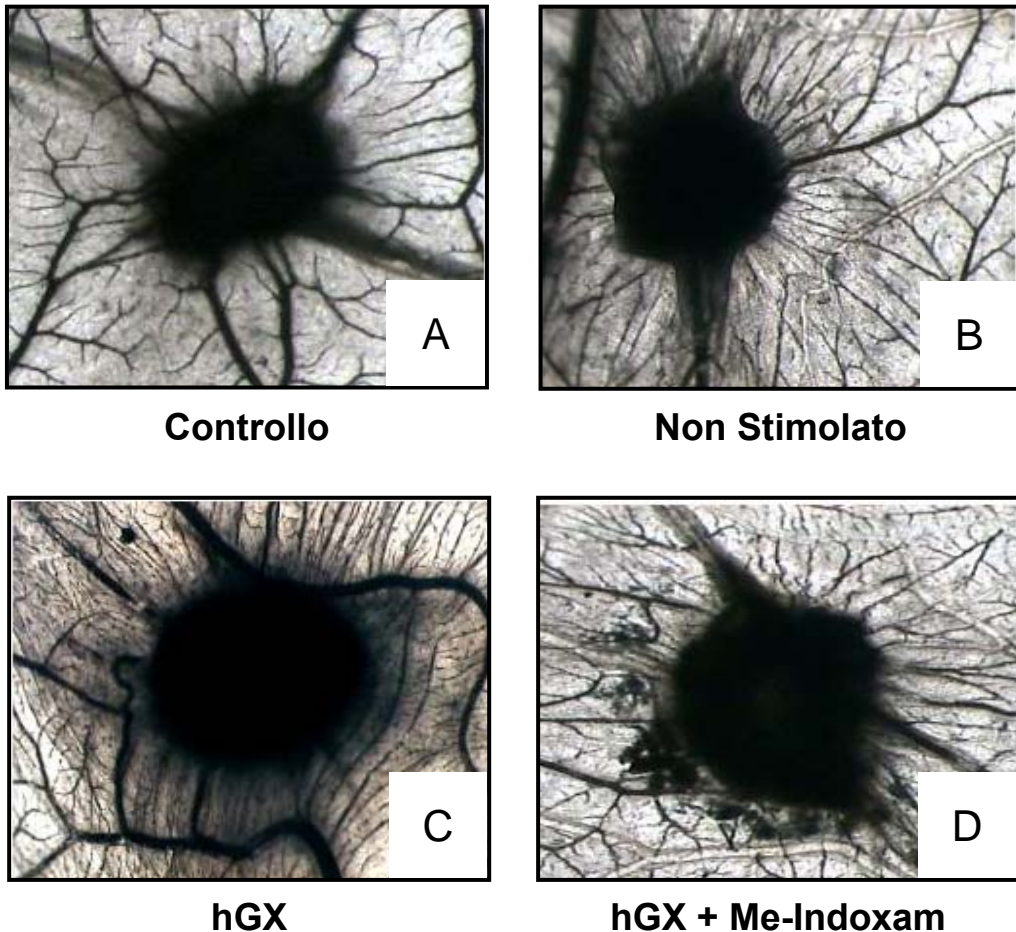
\*  $p < 0,05$  vs. controllo





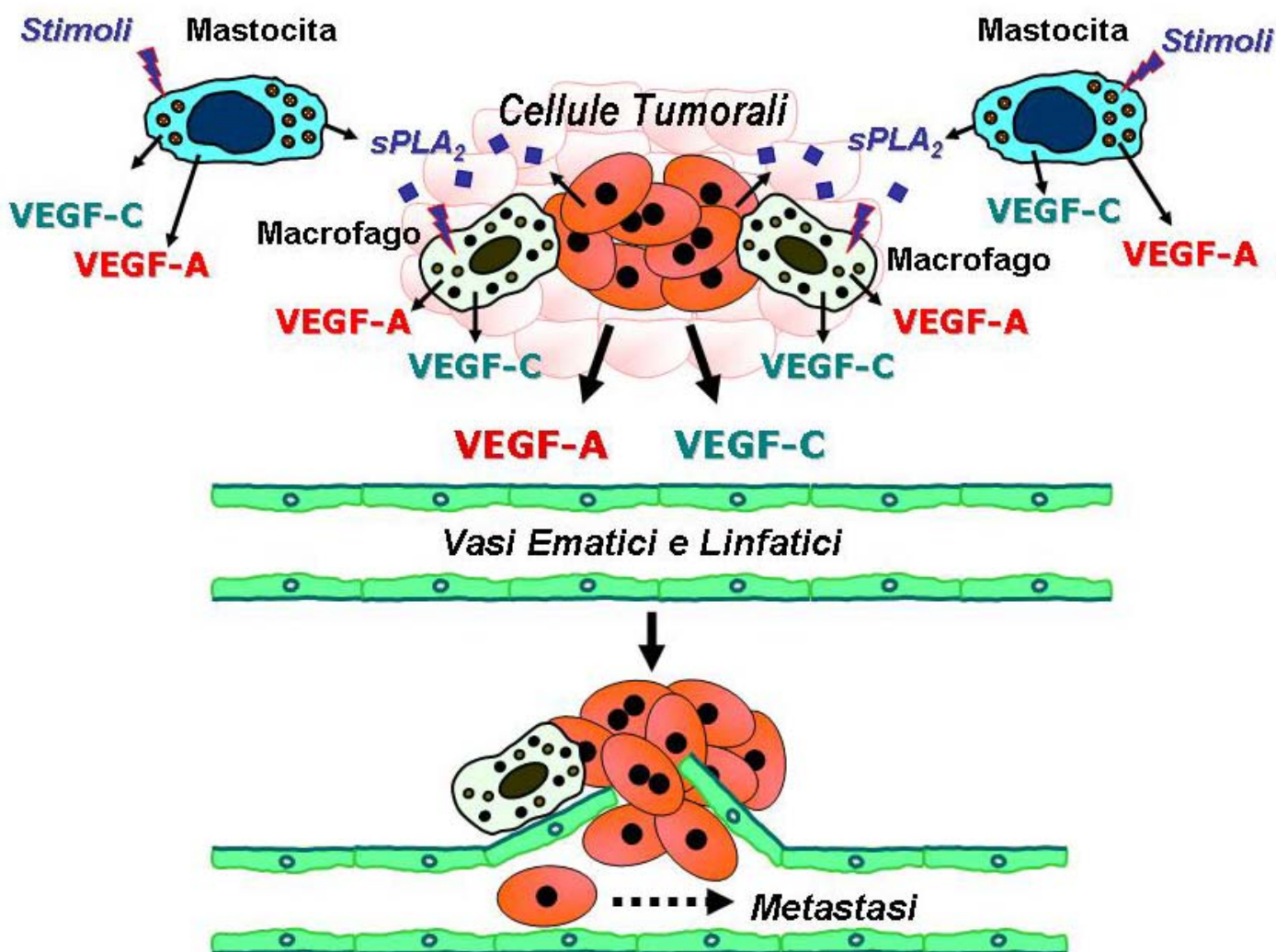
**Figura 17: Cinetiche dell'espressione di mRNA per VEGF in macrofagi umani stimolati con hGX.**

Il grafico riassume l'analisi in real-time RT-PCR per VEGF-A (●), e VEGF-C (○) negli HLM incubati con hGX (3  $\mu$ g/ml) per i tempi indicati. L'espressione dell'mRNA per i VEGF è indicata come rapporto dell'intensità di segnale delle bande rispetto alle cellule non stimulate. I risultati sono stati normalizzati per GAPDH ed espressi come media  $\pm$  ES di tre esperimenti.



**Figura 18: Attività angiogenica dei sopranatanti degli HLM nelle CAM di embrione di pollo.**

Le CAM sono state impiantate con spugna di gelatina assorbita con buffer (A, controllo), con sopranatanti degli HLM incubati (24 ore a 37°C) con o senza (B, non stimolato) hGX (C,  $10^{-6}$  M) o con hGX pretrattata con Me-Indoxam (D). Le CAM sono state esaminate quotidianamente fino al dodicesimo giorno e fotografate *in ovo* con uno stereomicroscopio ed i vasi sanguigni infiltranti le spugne sono stati contati ad un ingrandimento 50x.



**Immagine:** I mastociti sono cellule che svolgono un ruolo primario nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi infiammatoria e neoplastica attraverso due meccanismi: il primo, diretto, avviene attraverso la produzione di fattori angiogenici; il secondo, di tipo indiretto, si esplica attraverso l'attivazione macrofagica indotta dal rilascio da parte dei mastociti di sPLA<sub>2</sub>.